

TITERBESTIMMUNGEN DER M-SUBSTANZ IN RELATION  
ZUM VIRULENZVERHALTEN DES HOMOLOGEN A-STREPTOKOKKENSTAMMES

von

JOHANN RIETHE

1964







Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie der  
Johannes Gutenberg-Universität Mainz  
Direktor: Prof. Dr. med. P. Klein

TITERBESTIMMUNGEN DER M-SUBSTANZ IN RELATION  
ZUM VIRULENZVERHALTEN DES HOMOLOGEN A-STREPTOKOKKENSTAMMES

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen Fakultät

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

JOHANN RIETHE

aus Sprendlingen/Rhh.

MAINZ 1963

Dekan: Prof. Dr. Dr. K. Wagner

Referent: Prof. Dr. E. v. Wasielewski

Korreferent: Prof. Dr. H. Kliewe

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Februar 1964



Gesamtherstellung: Ditters Bürodienst, Mainz  
Augustinerstraße 64-66

# INHALTSVERZEICHNIS

|                                                      | Seite |
|------------------------------------------------------|-------|
| Einleitung .....                                     | 1     |
| Hauptteil .....                                      | 2     |
| I. Extracelluläre A-Streptokokkenprodukte .....      | 3     |
| 1. Streptolysin O .....                              | 3     |
| 2. Streptolysin S .....                              | 4     |
| 3. Proteinase (n) .....                              | 4     |
| 4. Hyaluronidase .....                               | 5     |
| 5. Streptokinase .....                               | 5     |
| 6. DPN-ase .....                                     | 6     |
| 7. Zusammenfassung .....                             | 6     |
| II. Strukturelemente der A-Streptokokken .....       | 7     |
| 1. P-Substanz .....                                  | 8     |
| 2. C-Substanz .....                                  | 8     |
| 3. T-Substanz .....                                  | 8     |
| 4. R-Antigen .....                                   | 10    |
| 5. Hyaluronsäure .....                               | 11    |
| 6. M-Substanz .....                                  | 12    |
| a) Serologische Bedeutung .....                      | 12    |
| b) Biosynthese .....                                 | 12    |
| c) Chemisch-physikalische Eigenschaften .....        | 13    |
| d) Struktur .....                                    | 14    |
| e) M-Substanzgehalt, Kolonienform und Virulenz ..... | 15    |
| f) Antikörper und Immunität .....                    | 16    |
| g) Phagocytose .....                                 | 18    |
| 7. Zusammenfassung .....                             | 19    |
| Spezieller Teil                                      |       |
| I. Auswahl und Züchtung der Stämme .....             | 21    |
| a) Virulenzsteigerung .....                          | 23    |
| b) Virulenzabschwächung .....                        | 25    |
| c) Virulenzmessung .....                             | 26    |
| d) Ergebnisse .....                                  | 26    |
| II. Herstellung der Anti-M-Seren .....               | 28    |
| a) Auswahl der Immunisierungstiere .....             | 28    |
| b) Herstellung der Vaccine .....                     | 28    |

|                                                            |    |
|------------------------------------------------------------|----|
| c) Immunisierung .....                                     | 29 |
| d) Blutentnahme .....                                      | 30 |
| e) Absorption .....                                        | 31 |
| f) Bestimmung des Antikörpertiters .....                   | 32 |
| g) Ergebnisse .....                                        | 32 |
| III. Virulenzgrad und Titerbestimmung der M-Substanz ..... | 33 |
| a) Bestimmung der Virulenz .....                           | 34 |
| b) Darstellung der M-Substanz .....                        | 37 |
| c) Prüfung der serologischen Reaktivität .....             | 40 |
| Ergebnisse .....                                           | 43 |
| Diskussion .....                                           | 45 |
| Zusammenfassung .....                                      | 47 |
| Literaturverzeichnis .....                                 | 48 |

## EINLEITUNG

Unsere Untersuchungen befassen sich mit der Bedeutung der M-Substanz für die Virulenz von A-Streptokokken. Insbesondere soll erörtert werden, ob eine quantitative Beziehung zwischen M-Substanzgehalt und Virulenzgrad besteht, also der Virulenzanstieg durch eine Mehrproduktion von M-Substanz bedingt ist.

Wir wählten die M-Substanz, weil sie eine Sonderstellung innerhalb der Leibessubstanzen der A-Streptokokken einnimmt. Sie ist nicht nur ein bedeutender Virulenzfaktor, sondern bewirkt auch die typenspezifische Immunität und ist somit die Grundlage für die serologische Typisierung der A-Streptokokken.

M-Substanz (typenspezifisch) und C-Substanz (gruppenspezifisch) brachten außer einer einheitlichen Systematik auch entscheidende Erkenntnisse über die Epidemiologie und Pathogenese dieser Keimgruppe.

So erkannte man, daß bis zu 95 % der menschlichen Streptokokkeninfektionen durch Erreger der serologischen Gruppe A bedingt sind.

Die Gesamterkrankungsrate an Streptokokkeninfektionen ist schwierig zu bestimmen. Für die USA schätzt man über sieben Millionen Erkrankungen, von denen etwa 3 % zu rheumatischem Fieber führen (DENNY, 14).

Die einheitliche Systematik förderte auch die Suche nach dem Scharlachstreptococcus, dem Erreger des rheumatischen Fiebers und der Glomerulonephritis. Heute wissen wir, daß eine ätiologische Zuordnung zu bestimmten Typen der A-Streptokokken nicht möglich ist. Zwar ist z. B. bei der Glomerulonephritis eine auffällige Häufung der Typen 12, 6 und 4 feststellbar, aber sie kann auch durch alle anderen Typen hervorgerufen werden. Die Ursache ist keine spezifische pathogene Eigenschaft eines bestimmten Keimes, sondern eine zeitlich und örtlich variierende Typenbevorzugung bzw. -verteilung (zit. v. WASIELEWSKI, 111).

Neuere Untersuchungen richten sich hauptsächlich auf das Mosaik der Leibessubstanzen und die extracellulären Produkte der A-Streptokokken.

Wenn man die Bedeutung einer bestimmten Substanz für die Virulenz von A-Streptokokken klar abgrenzen will, so setzt dies die Kenntnis der möglichen anderen Faktoren voraus. Wir werden deshalb die hinsichtlich der Virulenz wichtigen extracellulären Produkte und Leibessubstanzen der A-Streptokokken einzeln besprechen.

## HAUPTTEIL

Die Suche nach virulenz-determinierenden Faktoren basiert im allgemeinen auf dem Vergleich virulenter und avirulenter Mutanten der gleichen Art. Alle Unterschiede zwischen solchen Varianten kommen als Virulenzfaktoren in Betracht.

Diese Untersuchungen haben hauptsächlich zwei Fehlerquellen, denn avirulente Keime vermehren sich meist nur *in vitro*. Man konnte aber bedeutende Unterschiede zwischen *in vivo* und *in vitro* gewachsenen Mutanten aufzeigen. Andererseits werden chemische und biologische Aspekte weitgehend vom Nährmilieu beeinflußt. Welche Bedingungen muß nun eine Substanz erfüllen, damit sie als Virulenzfaktor anerkannt wird?

Am einfachsten sind die Forderungen für ein Toxin zu formulieren:

Es muß eine Krankheit auslösen können, der virulente Stamm muß es produzieren, während dem avirulenten diese Potenz fehlt, und das Antitoxin sollte gegen natürliche wie experimentelle Infektionen Schutz gewähren (MILES, 77).

So ideal diese Kriterien vom Tetanustoxin erfüllt werden, so selten findet man solche Toxine.

Viele isolierte Toxine sind wenig wirksam und werden von virulenten wie avirulenten Stämmen gebildet. So z. B. die Streptolysine der A-Streptokokken. Sie werden von dem avirulenten und dem virulenten Stamm des Typs 14 gebildet. Die avirulente Mutante produzierte *in vitro* sogar eine beträchtliche Menge mehr an Streptolysin O und S (BARKULIS, 4).

Noch schwieriger wird die Analyse, wenn die Substanz keine antigene Wirkung besitzt. Dann müssen sich unsere Forderungen auf eine signifikante Wirkung *in vivo* und auf eine Verbindung mit der virulenten Mutante beschränken.

Bei der Erforschung der virulenzbestimmenden Faktoren wandelten sich die Blickpunkte in den letzten zwanzig Jahren. Während zuerst vorwiegend Ekto- und Endotoxine hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Virulenz von Mikroorganismen untersucht wurden, erwecken jetzt Erregerenzyme, Strukturbestandteile und Zwischenprodukte bei der Wechselwirkung Keim - Wirt das Hauptinteresse.

Die A-Streptokokken bieten eine Reihe von Substanzen, deren Bedeutung für die Virulenz dieser Mikroorganismen zu untersuchen ist. Die wichtigsten sind nachfolgend aufgezählt:

### Extracelluläre Substanzen

Streptolysin O  
Streptolysin S  
Erythrogenes Toxin  
Streptokinase  
Proteinase (n)  
Hyaluronidase  
DPN-ase  
Nukleasen

### Leibessubstanzen

C-Polysaccharid  
M-Protein  
T-Antigen  
R-Antigen  
P-Substanz  
(Hyaluronsäure)

Im folgenden werden diese Substanzen im einzelnen besprochen, wobei wir die extracellulären Produkte der A-Streptokokken nur summarisch behandeln und speziell auf die derzeitigen Kenntnisse über die Bedeutung der M-Substanz eingehen.

## I. EXTRACELLULÄRE PRODUKTE

Die extracellulären A-Streptokokkenprodukte können letale Intoxikationen auslösen. Welche Faktoren im einzelnen dafür verantwortlich sind, ist nicht bekannt (McCARTHY, 68; McLEOD, 74). Die bisher isolierten und bezüglich ihrer toxischen Wirkung näher untersuchten Substanzen sind:  
Streptolysin O und Streptolysin S.

Die toxische Wirkung von Streptokokkenkulturfiltraten beschränkt sich sicher nicht auf die Streptolysine und das erythrogene Toxin. Außer ihnen werden im Verlaufe des Wachstums auch Endotoxine frei. Eine Reihe von Gewebsläsionen dürften im Sinne allergischer Reaktionen zu deuten sein. Schließlich können sich Effekte mehrerer Produkte, z.B. Enzyme und Toxine, summieren.

### 1. Streptolysin O

Es ist ein thermo- und sauerstofflabiles Protein, das von Streptokokken im Verlaufe der logarithmischen Wachstumsphase gebildet wird. Seine Antigenität hat große Bedeutung für die Diagnostik des rheumatischen Fiebers (BERNHEIMER, 6). Die cytotoxische Wirkung erstreckt sich auf alle Zellen. Am bekanntesten ist seine hämolytische Fähigkeit (BERNHEIMER, 6). Am Säugetierherzen konnte BERNHEIMER (6) mit subletalen Dosen einen Sensibilisierungseffekt erzeugen, der bei nachfolgender Verabreichung einen systolischen Herzstillstand auslöste. Bei der Prüfung des letalen Effektes für Mäuse fanden BERNARD und TODD (5) eine minimale le-

tale Dosis von 0,044 mg der gereinigten Substanz. Die verstorbenen Tiere zeigten bei der Sektion: Lungenödem, pulmonale Hämorrhagien und intravasale Hämolyse.

Die hämolytische Wirkung des Streptolysin O genügt nicht, um allein den Tod der Tiere auszulösen (BERNHEIMER, 6).

## 2. Streptolysin S

Die chemische Natur dieses Toxins ist unbekannt. Die Hauptwirkung ist an die Polynukleotidfraktion gebunden (BERNHEIMER, 6). Seine Produktion wird durch Serum und Hefenukleinsäuren stimuliert.

Das Toxin scheint keine spezifischen Antikörper zu erzeugen. Nach Streptokokkeninfektionen können unspezifische Inhibitoren nachgewiesen werden, jedoch nicht, wenn Streptolysin S alleine verabreicht wird.

Die Beurteilung der toxischen Wirkung des Streptolysin S ist schwierig, da das Produkt sehr labil ist und praktisch nie ganz von Streptolysin O gereinigt werden kann.

Intravenöse Injektionen verursachen Hämolyse, Degeneration der Tubulusepithelien der Niere, trübe Schwellung des Leberparenchyms und fleckförmige Herzmuskelnekrosen.

## 3. Proteinase (n)

Die Fähigkeit der Streptokokken, gewisse Eiweiße zu spalten, ist schon länger bekannt. Erst die Untersuchungen von ELLIOT (18) und ELLIOT und DOLE (19) erweckten ein besonderes Interesse an diesen Enzymen. Die Autoren zeigten, daß die Proteinasen aus Streptokokkenkulturfiltraten nicht nur Kasein, Milch und Fibrin abbauen können, sondern auch das keimeigene M-Protein angreifen.

In der logarithmischen Wachstumsphase der A-Streptokokken wird das Proenzym gebildet und diffundiert in die Umgebung. Regelmäßig sind auch Spuren von aktivem Enzym nachweisbar. Im reduzierenden Milieu kommt es zur autokatalytischen Umwandlung in die aktive Proteinase. Der Prozeß kann durch Sulfhydrylkomponenten, Cyanid und Trypsin stimuliert werden. Monojodessigsäure inaktiviert diese Umwandlung irreversibel. Ein weiterer Befund ELLIOTs war, daß mäusevirulente A-Streptokokken, die praktisch immer M-Substanz besitzen, keine oder nur sehr wenig Proteinase enthalten. Bei Mäusepassagen

ließ sich bei ansteigender Virulenz und M-Substanzbildung eine deutliche Verringerung des Proteinasebildungsvermögens feststellen. Glossy-Dissozianten der A-Streptokokken enthalten kaum M-Substanz, dafür aber durchschnittlich größere Mengen Proteinase.

Die Proteinasebildung kann gehemmt werden, wenn man die Streptokokkenkulturen bei 22°C bebrütet oder 2% Mäuseserum zusetzt (ELLIOT, 18). In neopectonhaltigen Nährmedien wird praktisch nur das Proenzym entwickelt.

Die pathogenetische Bedeutung der Proteinase dürfte hauptsächlich auf ihrer antagonistischen Wirkung zur M-Substanz beruhen.

#### 4. Hyaluronidase

Die Beurteilung der Hyaluronidase für die Virulenz von A-Streptokokken ist problematisch, da die Keime sowohl Hyaluronsäure als auch Hyaluronidase produzieren können.

Die Hyaluronsäure hat eine meßbare antiphagocytäre Wirkung (ROTHBARD, 91), während die Hyaluronidasebildung als ein invasionsfördernder Mechanismus angesehen wird (McLEOD, 74). Außerdem ist eine substratabhängige, adaptive Mehrproduktion beobachtet worden (SALLMANN und BIRKELAND, 92).

PIKE (84/85) weist darauf hin, daß "bekapselte" Keime (= hyaluronsäurebildende) erst Hyaluronidase bilden, wenn die Hyaluronsäure in die Umgebung diffundiert ist.

Da die "Hyaluronsäurekapsel" hauptsächlich ein Merkmal junger Streptokokkenkulturen ist, die Hauptmenge der Hyaluronidase aber erst gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase auftritt, müssen sich beide Produkte nicht gegenseitig ausschließen (v. WASIELEWSKI, 108).

Auf Grund dieser Befunde kann man annehmen, daß das Hyaluronidasebildungsvermögen ein Virulenzfaktor ist. Wie stark die Virulenz von ihm beeinflusst wird, ist noch nicht bekannt.

#### 5. Streptokinase

Die Streptokinase bewirkt als spezifischer Aktivator des Serumplasminogens die fibrinolytische Aktivität der A-Streptokokken. Über den Aktivierungsprozeß gibt es zwar viele Hypothesen, aber noch keine einheitliche Meinung. Jedenfalls sind die Streptokokken der Gruppe "human C" und nachfolgend die

der Gruppe A die stärksten der bekannten Aktivatoren. Ihre Wirkung führt in vivo zur Durchbrechung der Fibrinschranke und könnte durch Fibrinabbau phlogogene Menkinstoffe entstehen lassen (v. WASIELEWSKI, 111). McLEOD (74) spricht ihr eine fördernde Wirkung auf das Invasionsvermögen der Keime zu. Eine adaptive Mehrproduktion konnte jedoch nicht beobachtet werden (v. WASIELEWSKI, 108).

## 6. Diphosphopyridinnukleotidase

Werden diphosphopyridinnukleotidasebildende Stämme phagocytiert, so verursachen sie eine rasche Immobilisation und Lysis der Leukocyten. Dem isolierten Enzym fehlt diese Wirkung (BERNHEIMER, 7). Am Herzen wurde eine Hemmung der oxydativen Phosphorylierung beobachtet.

Das Enzym wird besonders reichlich von Stämmen der Typen 12 und 6 gebildet. Dieses auffällige Zusammentreffen mit den nephrogenen Stämmen wurde von BERNHEIMER (7) eingehend untersucht.

Aus dem uns zur Verfügung stehenden Schrifttum ist nicht ersichtlich, ob das DPN-asebildungsvermögen mit der Virulenz der A-Streptokokken verbunden ist. Jedenfalls bildet weder der avirulente noch der daraus gezüchtete virulente Stamm des Typs 14 eine DPN-ase (BARKULIS, 4).

## 7. Zusammenfassende Betrachtung der Bedeutung der extracellulären Produkte für die Virulenz von A-Streptokokken

Eine sichere Abgrenzung der Bedeutung einzelner extracellulärer Produkte für die Virulenz von A-Streptokokken ist heute noch nicht möglich, denn einerseits sind manche Enzyme noch nicht genügend untersucht und andererseits treten viele Enzyme nicht bei allen A-Streptokokken auf.

Am sichersten scheint die virulenzfördernde Funktion der Hyaluronidase zu sein. Die substratabhängige, adaptive Mehrproduktion ist ein bekannter Vorgang (SALLMANN und BIRKELAND, 92). Ihre invasionsfördernde Wirkung wird heute kaum bestritten (McLEOD, 74).

Bei der Streptokinase vermutet man ebenfalls eine Förderung des Invasionsvermögens der Keime, jedoch konnte keine adaptive Mehrproduktion festgestellt werden.

Von der DPN-ase kennt man nur die leukotoxische Wirkung und die Hemmung der oxydativen Phosphorylierung am Herzen. Ob sie eine virulenzsteigernde

Funktion hat, ist aus dem vorliegenden Schrifttum nicht ersichtlich.

Die Proteinase nimmt in bezug auf die Virulenz eine ambivalente Stellung ein. Einerseits kann sich ihre Wirkung gegen die invasionsfördernden Faktoren wie M-Substanz, Streptokinase und u.U. auch gegen die Hyaluronidase richten (ELLIOT, 21) und hätte somit eine Virulenzminderung zur Folge. Andererseits hat sie eine histolytische und fibrinolytische Wirkung, die Vorbedingungen für eine rasche Invasion der Keime schaffen könnte. Wann die eine oder andere Komponente in den Vordergrund tritt, hängt wahrscheinlich von den örtlichen Bedingungen ab. Nach heutiger Auffassung hat die Wirkungsentfaltung gegen die invasionsfördernden Faktoren die größte Bedeutung.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Exotoxinen der A-Streptokokken. Hier gelang es nicht, eine Relation zwischen Virulenzverhalten und Toxinproduktion festzustellen.

BARKULIS (4) konnte bei einem avirulenten und dem daraus gezüchteten virulenten A-Streptokokkenstamm Typ 14 in vitro eine höhere Streptolysin O- und S-Bildung des avirulenten aufzeigen. Außerdem hatten beide Stämme bei ausreichender Keimapplikation etwa bei gleichen Keimkonzentrationen in den Organen (Milz, Leber, Niere, Herz) einen letalen Effekt. Er schreibt daher: "It suggests that the essential differences in virulence of strains rest not in their capacity to form exotoxins in vivo, which probably brings about the death of animals, but in their ability to survive and multiply in the host to a point that allows a sufficient production of exotoxins."

## II. STRUKTURELEMENTE DER A-STREPTOKOKKEN

Die extracellulären Produkte der A-Streptokokken, die vorwiegend in der logarithmischen Wachstumsphase gebildet werden, können erst wirken, wenn die Keime im Gewebe haften und sich vermehren. So haben die Strukturelemente die entscheidende Bedeutung, zunächst Bedingungen zu schaffen, damit Exotoxine und Enzyme ihre Wirkung entfalten können.

In diesem Abschnitt werden wir auch die "Hyaluronsäurekapsel" der A-Streptokokken besprechen. Sie nimmt eine Zwischenstellung ein, da sie einerseits von den Keimen selbst produziert wird, andererseits an deren Oberfläche haftet. Einige Autoren bezeichnen sie deshalb als Kapsel.

## 1. P-Substanz

Durch schonende Alkalibehandlung und anschließende Säureausfällung in der Kälte konnte LANCEFIELD (48) eine Fraktion isolieren, die chemisch aus Nukleinsäuren, Nukleoproteinen und Proteinen besteht. Ihr bedeutsamster Anteil sollen die Nukleoproteine sein, die den größten Teil der Streptokokkenleibessubstanz darstellen (SWIFT, 103).

Das Nukleoprotein ist auch in anderen grampositiven Kokken (Staphylokokken, Pneumokokken) nachweisbar. Es ist ein echtes Antigen (LANCEFIELD, 48).

Pathogenetisch sind lediglich anaphylaktische Reaktionen beobachtet worden. Mit der Virulenz der A-Streptokokken scheint die Substanz nicht verbunden zu sein (LANCEFIELD, 48).

## 2. C-Substanz

Die gruppenspezifische Substanz der A-Streptokokken ist ein Polysaccharid (LANCEFIELD, 58). Sie kann durch Säurehydrolyse (LANCEFIELD, 58), Formamidextraktion (FULLER, 26) und fermentativ mit dem Kulturüberstand von *Streptomyces albus* (MAXTED, 75) dargestellt werden.

Die Substanz konnte auch aus Streptokokkenzellwänden isoliert werden (SALTON, 93; McCARTY, 67). Nach neueren Untersuchungen ist sie ein Strukturelement der Zellwand, von der sie etwa  $\frac{2}{3}$  des Gesamtgewichtes ausmacht.

Das Polysaccharid besteht aus Rhamnose und Glukosamin. Die beiden Komponenten sollen nach McCARTY (67) im Verhältnis 1,6 : 1 vorhanden sein, während SCHMIDT (zit. LANCEFIELD, 58) bei gleichen Stämmen, aber verschiedener Methode andere Daten erlangte.

Eine pathogenetisch bedeutsame Entdeckung machte McCARTY (71): Er bemerkte im Verlauf von Mäusepassagen einen Verlust der Gruppenspezifität zugunsten einer neuen. Die chemische Analyse des neuen Polysaccharids ergab eine andere Verteilung von Rhamnose und Glukosamin (zit. LANCEFIELD, 58).

Die gereinigte C-Substanz hat keine toxische Wirkung, aber anaphylaktische Reaktionen sind auslösbar (LANCEFIELD, 58). C-Antikörper verleihen keinen Infektionsschutz (LANCEFIELD, 58).

## 3. T-Substanz

Antiseren der Glossy-Dissozianten von A-Streptokokken (kaum M-Substanz) reagieren nicht mit dem M-Antigen des homologen Stammes. Gelegentlich

konnte man aber Präzipitationen mit dem homologen Glossy-Typ beobachten. Diese Befunde deuteten LYONS und WARD (65) als eine Reaktion eines bisher unbekannten Antigen-Antikörpersystems. Diese Hypothese wurde durch Glossy-Stämme, die Antigene gegen Matt- und Glossy-Formen aufwiesen, unterstützt.

LANCEFIELD (47, 48) bewies die neue Fraktion, indem mit homologer M-Substanz absorbierte Seren trotzdem mit Glossy-Stämmen präzipitierten.

Der Name "T-Antigen" weist darauf hin, daß man ursprünglich glaubte, es sei ein neues typenspezifisches Antigen. Diese Ansicht wurde wieder eingeschränkt, da manche Stämme zwei "T" und ein "M", andere ein "T" ohne "M", und viele durch M-Antigen unterscheidbare ein gleiches T-Antigen besaßen.

Eine Übersicht über die T-Antigenverteilung einiger Typen zeigt Tabelle 1 (nach LANCEFIELD, 58).

Tabelle 1

| Typ | Antigen-zusammensetzung |            | Antigen-Varianten                                                     |
|-----|-------------------------|------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 1   | M 1                     | T 1        | 1) M 1, T 1<br>2) M 1<br>3) T 1<br>4) nichts                          |
| 2   | M 2                     | T 2        | 1) M 2, T 2<br>2) T 2                                                 |
| 3   | M 3                     | T 3        | 1) M 3, T 3<br>2) M 3, T 3, T 1 (Stamm S 203)                         |
| 15  | M 15                    |            | 1) M 15 ein "T",                                                      |
| 17  | M 17                    |            | 2) M 17 das diesen                                                    |
| 19  | M 19                    | ein oder   | 3) M 23 3 Typen ge- ein "T",                                          |
| 23  | M 23                    | mehrere    | meinsam ist das allen                                                 |
|     |                         | gemeinsame | 6 Typen                                                               |
|     |                         | T-Antigene | gemeinsam                                                             |
| 30  | M 30                    |            | 4) M 19 ist                                                           |
| 47  | M 47                    |            | 5) M 30 ein anderes "T",<br>6) M 47 das diesen zwei                   |
| 12  | M 12                    | T 10, T 12 | gemeinsam ist<br>1) M 12, T 10<br>2) M 12, T 12<br>3) T 10<br>4) T 12 |

Tabelle 1: Zusammenstellung der T- und M-Antigenverteilung einiger Typen:

Es ist augenscheinlich, daß bei einem Typ alle Kombinationen zwischen T- und M-Antigen auftreten können. Bei den Typen 15, 17, 19, 23, 30 und 47 dürfte es fast unmöglich sein, sie alleine durch die T-Agglutination zu bestimmen.

Eine hohe Wertigkeit der M-Fraktion kann die T-Agglutination ebenfalls verhindern (LANCEFIELD und STEWART, 54).

Die ersten Typisierungen von GRIFFITH (27, 28) beruhten wahrscheinlich teils auf dem Nachweis des M-, teils auf dem des T-Antigens (KÖHLER, 42).

Chemisch ist die T-Substanz ein nukleinsäurefreies Protein. Es ist alkohol-löslich, schwer durch proteolytische Enzyme angreifbar, hitzeresistent und säurestabil. Erst halbstündige Erhitzung auf 80°C oder mehrstündige Verdauung mit Trypsin vermag es zu inaktivieren.

Die Mikroanalyse der gereinigten T-Substanz ergab:

|       |   |         |
|-------|---|---------|
| N     | = | 14,25 % |
| C     | = | 50,11 % |
| H     | = | 7,42 %  |
| Asche | = | 1,9 %   |

Das Ultraviolett-Absorptionsspektrum mit dem Maximum bei 378 m $\mu$  und dem Minimum bei 254 m $\mu$  ist gleichfalls typisch für ein Protein, ebenso die einheitliche Wanderung in der Elektrophorese bei pH 7.

T-Antikörper verleihen keinen Infektionsschutz (LANCEFIELD, 58). Mit der Virulenz hat die T-Substanz ebenfalls keine Verbindung. Es scheint ihr also keine Bedeutung hinsichtlich der Pathogenität und Infektiosität von A-Streptokokken zuzukommen (LANCEFIELD, 58).

#### 4. R-Antigen

Viele Jahre glaubte man, Typ 28 besitze ein besonderes M-Antigen. Während das spezifische Antigen aller Typen gegen proteolytische Enzyme hochempfindlich war, zeichnete sich diese Substanz durch eine hohe Resistenz gegen Trypsin und Chymotrypsin aus. Mit Pepsin war sie hingegen leicht zerstörbar (LANCEFIELD, 57). Völlig R-antikörperfreie Antiseren gewähren Mäusen jedoch Schutz gegen Injektionen mit virulenten A-Streptokokken des Typs 28. Man glaubt deshalb, daß in Typ 28 mehrere Typen zusammengefaßt sind,

deren M-Antigenwirkung von der des R-Antigen überlagert wird (LANCEFIELD, 58).

Das R-Antigen ist nicht auf Typ 28 beschränkt; es tritt auch bei Typ 3 (LANCEFIELD, 60) und einigen anderen Stämmen der Gruppen B, C und G auf.

Es kann durch fermentative Aufspaltung von der Bakterienzelle isoliert werden, ohne daß seine serologische Reaktivität zerstört wird. Hierzu kommen in Betracht: Trypsin, Streptokokkenproteinase und das lytische Agens des *Streptomyces albus* (LANCEFIELD, 58).

Die Mikroanalyse einer weitgehend gereinigten R-Substanz ergab:

|   |   |         |
|---|---|---------|
| C | = | 51,82 % |
| H | = | 7,6 %   |
| N | = | 14,68 % |
| S | = | 1,04 %  |

Im Ultraviolett-Absorptionsspektrum hat sie ein Maximum bei 280 m $\mu$  und ein Minimum bei 254 m $\mu$ . In der Elektrophorese wandert sie ziemlich einheitlich bei pH 4,6.

Pathogenetisch konnte man keine Wirkung des R-Antigens feststellen. Mit der Immunität und Virulenz der A-Streptokokken ist sie nicht verbunden.

## 5. Hyaluronsäure

Die Mucopolysaccharide der A-Streptokokken nehmen eine Mittelstellung zwischen exogenen und den zur Struktur gehörenden Substanzen ein. Einerseits werden sie von den Keimen sezerniert, andererseits haften sie aber an deren Oberfläche. Manche Autoren bezeichnen sie deshalb als Kapsel.

Nach DUBOS (17) ist die Schleimhülle als eine echte exkretorische Leistung aufzufassen, wobei die Hyaluronsäure nur infolge ihrer hohen Viskosität an der Bakterienoberfläche haftet. Auf der Blutplatte imponieren die "bekapselten" Streptokokken als Mucoid-Formen.

KENDALL, HEIDELBERGER und DAWSON (39) zeigen, daß die Schleimhülle der A-Streptokokken aus Hyaluronsäure besteht. Sie setzt sich aus gleichen Teilen Glukosamin und Glukuronsäure zusammen. Als einzige der bekannten Oberflächenkomponenten besitzt sie keine Antigenität.

Großes Interesse erweckte sie durch ihre Verbindung mit der Virulenz der A-Streptokokken. ROTHBARD (91) stellte anhand der Phagocytoseschutzwirkung

im bakteriostatischen Test und im Mäuseschutzversuch fest, daß die Hyaluronsäure einen meßbaren Einfluß auf die Virulenz von A-Streptokokken hat. Hyaluronidaseapplikationen erleichtern die Phagocytose durch Zerstörung der "Hyaluronsäurekapsel". Sie gewähren im Mäuseschutzversuch einen Infektionsschutz bis zur 10-fachen MLD gegen virulente A-Streptokokken (ROTHBARD, 91). M-Antikörper gewährten hingegen einen Schutz bis zur hunderttausendfachen MLD. Die Wirkung der Antikörper und der Hyaluronidase summiert sich.

## 6. M-Substanz

### a) Serologische Bedeutung

Die Typen bestimmt man mit verschiedenen Methoden: der Präzipitation (LANCEFIELD, 55), der Objektträgeragglutination (GRIFFITH, 27, 28) und dem passiven Mäuseschutzversuch (DOCHEZ, 16). M- und T-Substanz bilden die Grundlage für Präzipitation und Agglutination. Beides sind typenspezifische Substanzen, aber jede hat als Diagnostikum einige Vor- und Nachteile.

Die M-Substanz ist für jeden Typ charakteristisch. Glossy-Dissozianten von A-Streptokokken enthalten jedoch so wenig M-Substanz, daß sie nicht mit Anti-M-Seren reagieren.

Bei der T-Substanz treten gelegentlich in verschiedenen Typen gemeinsame Antigene auf. Es sind ebenfalls Typen bekannt, die mehrere T-Antigene besitzen.

Deshalb wird die M-Präzipitation und die T-Agglutination häufig kombiniert verwandt.

### b) Biosynthese

Trypsin baut die M-Substanz von A-Streptokokken ab, ohne die Lebensfähigkeit der Keime zu beeinträchtigen. Da die Potenz, M-Protein zu produzieren, genetisch fixiert ist, kann man durch Zusatz verschiedener Nährsubstrate die essentiellen Faktoren für die M-Substanzsynthese bestimmen.

Zunächst wurden trypsinbehandelte Streptokokken in Hirn-Herz-Extrakt mit 5% defibriniertem Schafsblut inkubiert. Nach 90 min hatten behandelte wie unbehandelte Keime annähernd gleiche Mengen M-Substanz. Die Resynthese erfolgte in dem optimalen Nährmedium außerordentlich schnell (FOX und KRAMPITZ, 25).

Genauere Untersuchungen zeigten, daß zur Neusynthese drei Komponenten nötig sind: Aminosäuren, Polypeptide (Casein) und Glukose.

Nun konnte man feststellen, welche Aminosäuren essentiell sind. Da die M-Substanz wenig aromatische Aminosäuren enthält, gab man die Keime in ein Nährsubstrat ohne Tryptophan und Phenylalanin. Dieser Nährboden veranlaßte jedoch nur eine geringe Resynthese, während Medien ohne Lysin und Isoleucin eine bessere M-Substanzproduktion zeigten.

Eine optimale M-Substanzsynthese wird erreicht, wenn außer Glukose und Polypeptiden die acht Aminosäuren: Alanin, Threonin, Arginin, Glutaminsäure, Histidin, Isoleucin, Prolin und Valin vorhanden waren. Alle acht Aminosäuren waren essentiell. Sie konnten entweder in freier Form oder in Polypeptiden vorhanden sein.

Die Glukose dient wahrscheinlich als Energiequelle. In Gegenwart von Aminosäuren und Polypeptiden wird sie schnell fermentiert. Da sie zu den obligaten Faktoren für die Resynthese gehört, versuchten FOX und KRAMPITZ (25), die M-Proteinsynthese durch Hemmung der Glykolyse zu verhindern.

Die bekannten Glykolysehemmer Natriumfluorid und Monojodessigsäure hemmen die M-Substanzsynthese und vermindern gleichzeitig den Milchsäureanteil auf ein Drittel.

Die Resynthese der M-Substanz ist nicht an die Wachstumsphase der Keime gebunden, denn nach 3-stündiger Inkubation bei 37°C konnte keine Erhöhung der optischen Dichte festgestellt werden. Ein Zusatz von 100 E/ml Penicillin verhindert zwar das Wachstum, aber nicht die M-Substanzsynthese.

### c) Chemisch-physikalische Eigenschaften

LANCEFIELD (43, 45) führte 1928 die Säurehydrolyse zur Antigengewinnung aus Streptokokken ein. Mit ihr erhielt sie Streptokokkenfraktionen, die sich mit Trypsin und Pepsin verdauen ließen, durch verdünnte Essigsäure gefällt wurden und einen hohen Stickstoffgehalt aufwiesen. Diese typischen Eigenschaften ließen ein Protein vermuten. Es schien jedoch keine antigene Wirkung zu haben.

HEIDELBERGER und KENDALL (32) isolierten danach eine Serie von Nukleoproteinen aus A-Streptokokken. Sie waren antigen und zeigten einen gewissen Grad von Typspezifität.

Es wurden viele andere Extraktionsmethoden versucht, aber immer enthielten die Fraktionen Nukleinsäuren. Eine von MUDD (79) isolierte A-Streptokokkenfraktion konnte von SEVAG (99) später als Nukleoprotein aufgeklärt werden. Sie bezeichneten das Substrat hinsichtlich seines chemischen und bio-

logischen Verhaltens als "nucleoproteid agglutinogen" (NPA). ZITTLE (118) behandelte die M-Fraktion mit Trypsin und Nukleasen. Da die antigene Spezifität durch Trypsin, aber nicht durch Nukleasen aufhebbar war, vermutete er, daß die Nukleinsäuren für die antigene Spezifität ohne Bedeutung seien.

Heute wissen wir, daß die M-Substanz ein reines Protein ist. Sie ist aber mit den Nukleinsäuren der Keime eng verknüpft. Das gereinigte M-Protein ist alkohollöslich, hat eine charakteristische Hitzeresistenz bei niedrigem pH (pH 2, 20 - 30 min) und ist sehr empfindlich gegen proteolytische Enzyme.

Die chemische Analyse eines nach LANCEFIELD und PERLMANN (56) gereinigten M-Proteins von A-Streptokokken Typ 1 ergab:

|   |   |         |
|---|---|---------|
| C | = | 50,71 % |
| H | = | 7,94 %  |
| N | = | 16,24 % |
| S | = | 2,46 %  |
| P | = | 0,0 %   |

Das Fehlen von Phosphor in der chemischen Analyse zeigt eindeutig, daß keine Nukleinsäure vorhanden ist.

Im Ultraviolett-Absorptionsspektrum hat das M-Protein ein Maximum bei einer Wellenlänge von 276 m $\mu$  und ein Minimum bei 255 m $\mu$ . In der Elektrophorese wandert das Endprodukt homogen bei pH 5,3.

Die gereinigte Substanz hat Antigenität. Schon nach 14-tägiger Immunisierung sind Antikörper nachweisbar.

#### d) Struktur

Studien an ganzen Streptokokken und deren Zellwänden zeigen, daß die M-Substanz ein Strukturelement der Zellwand ist. Hinweise auf die oberflächliche Lagerung ergibt schon die Möglichkeit, die Typen agglutinatorisch zu bestimmen und der tryptische Abbau der M-Substanz ohne Zerstörung der Zelle. Das M-Protein wird nicht in der Zellwand gebildet, denn es kann auch von L-Formen (Protoplasten von Streptokokkenzellen) produziert werden. Das M-Protein diffundiert hier in den Nährboden, während es bei vorhandener Zellwand in dieser gebunden wird (LANCEFIELD, 62).

Neuere Untersuchungen geben Aufschlüsse über die Struktur der Zellwand von A-Streptokokken und den Sitz der M-Substanz. Die Basisstruktur bildet das C-Polysaccharid. Es besteht aus Rhamnose und Hexosaminen, von denen letz-

tere auch in acetylierter und in Form von Muraminsäure (3-0-Carboxyaethylglukosamin) vorkommt (McCARTY, 67; SALTON, 93; CUMMINS und HARRIS, 12; BARKULIS und JONES, 2). Die Basisstruktur ist ihrerseits mit einem Peptid verknüpft, das aus 4 Alaninanteilen, einem Lysinanteil und einem Glutaminsäureisomer besteht.

Schematisch könnte man sich vorstellen, daß das Rückgrat von einer gestreckten Kette aus Rhamnose gebildet wird. (Es besteht aber auch die Möglichkeit, daß die Rhamnosekette verzweigt ist.) An diese sind Acetylglukosamine und in anderer Sequenz Muraminsäure gebunden. An die Muraminsäure schließen sich die oben beschriebenen Peptide an. Schließlich folgt das trypsinsensible äußere Proteinlager.

Die unbehandelte Zellwand ist 40% schwerer als die Basisstruktur. Ein Teil dieser 40% macht die M-Substanz aus, die wahrscheinlich an die Enden der definierten Peptideinheiten gebunden ist (BARKULIS, 4).

#### e) M-Substanz, Kolonienform und Virulenz

Nach DAWSON, HOBBY und OLMSTEADT (13) bezeichnen wir die Erscheinungsbilder der A-Streptokokkenkolonien mit: Matt, Glossy, Mucoid und Rough.

LANCEFIELD (45) gewann die typenspezifische Substanz zuerst aus Kolonien, die in der Matt-Form vorlagen. Die isolierte Substanz wurde hiernach M-Substanz genannt.

Die M-substanzhaltigen Matt-Formen waren virulent, während die M-substanzlosen Glossy-Formen avirulent waren. Nachdem DAWSON, HOBBY und OLMSTEADT nachweisen konnten, daß auch Mucoid-Formen M-Substanz bilden, gelang TODD und LANCEFIELD (105) auch deren Nachweis in Glossy-Formen. Der M-Proteingehalt ist jedoch so gering, daß sehr große Streptokokkenmengen zum Nachweis nötig sind.

Die Fähigkeit, M-Substanz zu bilden, scheint also allen Dissoziationsformen der A-Streptokokken zuzukommen, wobei allerdings die Menge verschieden ist (v. WASIELEWSKI, 108).

Eine Übersicht der Zusammenhänge zwischen Kolonienform, M-Substanzproduktion und Virulenz zeigt die nachfolgende Tabelle:

Tabelle 2

| Kolonienform | M-Substanzproduktion         | Virulenz  |
|--------------|------------------------------|-----------|
| matt         | viel                         | hoch      |
| glossy       | kaum bis nicht nachweisbar   | avirulent |
| mucoid       | viel                         | hoch      |
| rough        | keine oder nicht nachweisbar | avirulent |

Tabelle 2: Zusammenstellung der Beziehungen zwischen Kolonienform, Virulenz und M-Substanzproduktion

Abweichungen von dieser tabellarischen Zusammenstellung sind äußerst zahlreich: Manche avirulenten Stämme produzieren M-Substanz. Bei vielen anderen Stämmen sind die Kolonienformen von virulenten M-substanzbildenden nicht von avirulenten M-substanzbildenden zu unterscheiden. Die Erscheinungsbilder der Kolonien sind auch zeitabhängig. So können Mucoid-Formen nach längerer Bebrütungszeit - offenbar durch Einwirkung von Hyaluronidase - wie Matt-Kolonien aussehen.

Wegen dieser Unklarheiten schlug SWIFT (102) vor, Form und Funktion zu trennen, also Matt und Glossy auf das Erscheinungsbild der Kolonien zu beschränken. Da die Relation zwischen Virulenz, M-Substanz und Kolonienform für viele Stämme zutrifft, braucht man diesen Aspekt nicht vollkommen aufzugeben.

#### f) Antikörper und Immunität

Die M-Substanz verursacht die Bildung der typenspezifischen Antikörper. Sie sind durch Immunisierung mit ganzen Zellen, Zellwänden und der gereinigten M-Substanz erzeugbar.

Die einzelnen A-Streptokokkenmutanten haben einen unterschiedlichen Effekt auf die Antikörperbildung.

TODD und LANCEFIELD (105) immunisierten Kaninchen mit Matt- und Glossy-Kolonien. Quantitative Messungen zeigten nur bei mit Matt-Formen immunisierten Tieren deutliche Antikörpertiter. Da bekannt ist, daß die Matt-Dissozianten viel M-Substanz, die Glossy-Dissozianten wenig M-Substanz besitzen, veranschaulicht dieser Versuch die Bedeutung des M-Substanzgehaltes für die Antikörperbildung.

Die passive Schutzkraft der nach obigem Verfahren gewonnenen Immunsereen stellten sie durch gleichzeitige Applikation von Antiserum und homologem A-Streptokokkenstamm fest. Während M-substanzhaltige Stämme ohne Antiserum letale Infektionen auslösten, wiesen mit Antiserum behandelte Tiere einen Infektionsschutz auf, z. T. bis zur 10-fachen MLD. Mit Glossy-Formen hergestellte Seren hatten nur eine geringe Wirkung. Gegenüber heterologen Typen war kein Infektionsschutz vorhanden.

Die Experimente zeigen, daß die Antikörper typenspezifisch sind, ihre Menge oder Wertigkeit von dem M-Substanzgehalt abhängig ist und dem Gruppenantikörper kein nachweisbarer Infektionsschutz zukommt.

Welche Wirkung haben die Antikörper? TODD und LANCEFIELD (105) züchteten die Stämme in Kulturmedien, die spezifisches Antiserum enthielten. Quantitative Präzipitationen zeigten, daß ein Teil der ursprünglichen Matt-Formen einen beträchtlichen M-Proteinverlust aufwies, einige M-substanzfrei waren und andere nach über 90 Passagen nur einen geringen M-Substanzverlust hatten. Einige Stämme, die vorher eindeutig Matt-Formen waren, erschienen nachher als Glossy-Formen.

WATSON, ROTHBARD und SWIFT (112) glichen ihre Untersuchungen den menschlichen Verhältnissen an. Sie infizierten Affen intranasal und stellten desgleichen eine typspezifische Immunität fest. Deutliche Anti-M-Präzipitationen gab es nur bei Matt-Mutanten. "Bekapselte" M-Formen waren selten, "bekapselte" Glossy-Formen häufig phagocytiert.

Bei menschlichen Streptokokkeninfektionen konnte in den ersten Wochen immer eine hohe M-Substanzproduktion und eine deutliche Resistenz gegen die bakteriostatische Wirkung des Blutes festgestellt werden (ROTHBARD und WATSON, 90). Bei 42% der Erkrankten traten markante M-Substanzverluste auf. Bei 52% der Patienten blieben M-Substanzproduktion und Verhalten gegen Nativblut unverändert. Eine genauere Bewertung dieser Befunde wird durch das Fehlen der klinischen Bilder und die begrenzte Beobachtungszeit eingeschränkt.

Rezidive mit dem serologisch gleichen Typ wurden bis 1946 nicht beobachtet (v. WASIELEWSKI, 108). Mit dem Beginn der Antibiotikatherapie müßte die Rezidivhäufigkeit jedoch ansteigen, da der Körper nun keine Möglichkeit mehr hat, ausreichende Antikörpermengen zu bilden.

Untersuchungen über die Immunitätsdauer stützen sich auf den Nachweis persistierender Antikörper. Sie sind gelegentlich noch 20 bis 30 Jahre nach der Erstinfektion nachweisbar (LANCEFIELD, 61).

g) Phagocytose

BORDET (8) bezeichnet 1898 die Phagocytose als den Hauptabwehrmechanismus des Wirtes gegen Mikroorganismen. Ein Jahr später zeigten MARCHAND und WALLGREN (zit. FOLEY, 22), daß virulente A-Streptokokken gegen die Phagocytose resistent sind, während avirulente von den Leukocyten rasch aufgenommen werden.

Die M-Substanz der A-Streptokokken scheint der Hauptfaktor für die Phagocytoseresistenz zu sein, denn trypsinbehandelte (M-substanzfreie) Keime werden wie die avirulenten optimal aufgenommen. Noch bessere Phagocytoseeffekte werden erzielt, wenn außer Trypsinbehandlung auch typenspezifisches Antiserum und Hyaluronidase zugesetzt wird (MORRIS und SEASTONE, 78).

Die Streptokokken werden in den Leukocyten rasch vernichtet. Zerstört man die Leukocyten 20 min nach der Keimaufnahme mit Elektrizität (die Kokken werden hierdurch nicht beeinflusst), so sieht man, daß die größte Anzahl der Keime nicht mehr lebensfähig ist.

Allerdings beobachtete man später einige Stämme, die nach der Phagocytose die Leukocyten zerstörten (WILSON, 116). Mikroorganismen mit dieser Fähigkeit werden als leukotoxisch bezeichnet. Alle Stämme der Typen 6 und 12 scheinen leukotoxisch zu sein, während andere Typen leukotoxische und nicht-leukotoxische Vertreter haben (BARKULIS, 4).

Die Ursache der leukotoxischen Wirkung bestimmter A-Streptokokken soll die Diphosphopyridinnukleotidasebildung sein. BERNHEIMER (7) isolierte und untersuchte daraufhin 39 A-Streptokokkenstämme. Von diesen waren 29 leukotoxisch und bildeten DPN-ase, während von 10 nicht-leukotoxischen 8 keine DPN-ase besaßen.

Der Zusatz von 34 E/ml DPN-ase schädigt jedoch die Leukocyten nicht. BERNHEIMER (7) nahm deshalb an, das Enzym könne erst innerhalb der Leukocyten seine Wirkung entfalten. Aber eine Zugabe von nicht-leukotoxischen Streptokokken war ebenfalls erfolglos. Nach Meinung der Autoren schließen diese Befunde die vermutete Relation nicht aus, da unbekannt ist, wie das Enzym in die Zelle gelangt.

FOLEY (22, 23) untersuchte noch einmal den antiphagocytären Effekt von M-Substanz und "Hyaluronsäurekapsel" in Beziehung zur Oberflächenphagocytose. Sie fand, daß eine quantitative Beziehung zwischen M-Proteingehalt und der Phagocytoseempfindlichkeit der Keime besteht. Aber von 4 verschiedenen Stämmen waren zwei mit gleichem M-Substanzgehalt und verschiedener Kapselstärke nicht gleich empfindlich gegen die Phagocytose.

Der Stamm mit kleinerer Kapsel wurde schneller phagocytiert. Dies zeigt, daß auch die "Hyaluronsäure" einen meßbaren antiphagocytären Effekt hat. Die Wirkung war allerdings nicht stark, denn ein Keim mit breiter Kapsel, aber ohne M-Substanz wurde rasch phagocytiert.

Die Autoren nehmen an, daß in der ersten Zeit der Infektion die Hauptaufgabe der Mikroorganismen die Phagocytoseresistenz ist. Für die Wirtsabwehr sollen beim Infektionsbeginn hauptsächlich die Monocyten, später die polymorphkernigen Leukocyten verantwortlich sein.

Die extracellulären A-Streptokokkenprodukte scheinen keine Bedeutung für die Phagocytoseresistenz zu haben. Jedenfalls zeigten durch Hitze oder künstliches Quecksilberlicht abgetötete Keime (keine Bildung extracellulärer Produkte) gleiche antiphagocytäre Eigenschaften wie die lebenden (WILEY und WILSON, 114).

## 7. Zusammenfassende Betrachtung der Leibessubstanzen für die Virulenz von A-Streptokokken

Von den Leibessubstanzen der A-Streptokokken hat nur die "Hyaluronsäurekapsel" und die M-Substanz Einfluß auf das Virulenzverhalten dieser Keimgruppe.

Die "Kapsel" soll vorwiegend als Phagocytoseschutz wirken (ROTHBARD, 91; KASS und SEASTONE, 38). Tatsächlich gewähren Hyaluronidaseapplikationen einen Infektionsschutz gegen bekapselte A-Streptokokken bis zur 10-fachen MLD. Gleichzeitige Versuche mit typenspezifischen Antikörpern zeigten hingegen eine hunderttausendfache Schutzwirkung (ROTHBARD, 91). Gemessen an der M-Substanz hat die "Kapsel" einen geringen Effekt. Außerdem haben mitunter höchst-virulente Keime keine "Kapsel", aber immer M-Substanz.

Der entscheidende Faktor für das Virulenzverhalten der A-Streptokokken dürfte somit die Menge und Struktur der M-Substanz sein. Die beherrschende Rolle dieser Substanz soll noch einmal an einigen Versuchen von BARKULIS (4) gezeigt werden.

Er züchtete aus einem avirulenten, nicht typisierbaren A-Streptokokkenstamm einen virulenten Stamm vom Typ 14. Dann verglich er das Verhalten beider Stämme bei der Phagocytose und der Ausbreitung in der lebenden Maus. Dabei konnte er folgendes feststellen:

1. Wie andere Autoren (MARCHAND und WALLGREN (zit. FOLEY, 22); TODD und LANCEFIELD, 105; ROTHBARD, 91) sah er, daß avirulente

A-Streptokokken leicht phagocytiert wurden, während virulente resistent waren. Behandelte er aber die virulenten Keime mit spezifischen M-Antikörpern, so wurden sie ebenso leicht wie avirulente aufgenommen.

2. Fünf Stunden nach der Injektion von  $10^6$  Keimen beider Stämme waren in der Milz der Mäuse nur noch die virulenten lebensfähig.
3. Trypsinbehandelte Keime (M-Substanzabbau) verursachten eine signifikant geringere Absterberate als unbehandelte.
4. Nach 24-stündiger Vorbehandlung mit spezifischen M-Antikörpern war ein markanter Abfall der Keimvermehrung in vivo feststellbar.

Parallellaufend mit dem Virulenzanstieg beobachteten TODD und LANCEFIELD (105) eine Zunahme der M-Substanz. Diese Befunde deuten an, daß der Virulenzgrad eine Funktion des M-Substanzgehaltes ist.

Andererseits sahen TODD und LANCEFIELD (105) stark M-substanzhaltige A-Streptokokken in Dauerkulturen, die keine sonderliche Virulenz aufwiesen (matt-attenuated-form). Sie waren durch Tierpassagen in ihrer Virulenz gut steigerbar, ließen jedoch keine Zunahme der M-Substanz erkennen. Diese Befunde deuten auf eine adaptive Strukturveränderung hin.

## SPEZIELLER TEIL

Auf Grund der in dem Schrifttum angegebenen engen Kopplung zwischen M-Substanzgehalt und Virulenz der A-Streptokokken ist es naheliegend, diese näher zu untersuchen.

Es ist nun unsere Aufgabe festzustellen, ob eine Virulenzsteigerung auf einer mengenmäßigen Mehrproduktion von M-Substanz beruht.

Hierzu ergaben sich folgende Hauptpunkte:

1. Von einer Ausgangskultur beta-hämolytischer A-Streptokokken einen hoch- und schwachvirulenten Stamm zu züchten.
2. Ein spezifisches Anti-M-Serum durch Immunisierung von Kaninchen herzustellen.
3. Die Titer der M-Substanz des hoch- und schwachvirulenten Stammes zu bestimmen und zu vergleichen.

Die aufgeführten Punkte werden nachfolgend untersucht.

### I. AUSWAHL UND ZÜCHTUNG DER STÄMME

Wir benutzten beta-hämolytische A-Streptokokken unseres Untersuchungsbetriebes.

Die serologische Gruppendifferenzierung erfolgte nach den von LANCEFIELD (49) und FULLER (26) angegebenen Verfahren. Die Herstellung der Antigenextrakte nach FULLER zogen wir vor, da sie kleinere Keimmengen benötigt und deutlichere Reaktionen zeigt.

**Fuller-Extrakt:** Eine bei 37°C bebrütete, 18 bis 24-stündige 10 ml-Kultur des zu bestimmenden Streptokokkenstammes wird abzentrifugiert und mehrmals in steriler, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Das Keim-sediment versetzt man mit 0,3 ml Formamid und erhitzt es 12 - 15 min in einem Ölbad von 150 - 180°C. Die Eiweißkörper werden hierbei denaturiert; das gruppenspezifische Polysaccharid geht in Lösung. Um die Proteine zu fällen, wird 0,15 ml Salzsäurealkohol zugesetzt, der aus 5 ml n/1 Salzsäure durch Auffüllen mit 96% unvergälltem Aethylalkohol zu 100 ml hergestellt wurde. Nachdem die Eiweißkörper abzentrifugiert sind, versetzt man den Überstand (er enthält das gelöste Polysaccharid) mit 0,5 - 1,0 ml Aceton, bis eine deutliche Trübung eingetreten ist. Die Trübung wird abzentrifugiert und der Niederschlag in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert.

Anschließend neutralisiert man diesen Ansatz mit Natriumbicarbonatlösung. Manchmal tritt hierbei wieder eine leichte Trübung auf. Sie erfordert erneutes Abzentrifugieren. Die klare Flüssigkeit enthält das C-Polysaccharid und wird zur Präzipitation benutzt.

**LANCEFIELD-Extrakt:** Der Streptokokkenstamm wird in 40 - 50 ml 10% Traubenzuckerbouillon geimpft und 48 Std. bei 37°C bebrütet. Die abzentrifugierten Keime werden mehrmals gewaschen und mit n/20 HCl 12 min im Wasserbad bei 100°C erhitzt. Anschließend wird mit n/20 NaOH neutralisiert. Nach erneutem Zentrifugieren wird der Überstand abgegossen und mit dem 3-4-fachen Volumen 99% Äthylalkohol versetzt. Der Ansatz bleibt über Nacht im Kühlschrank. Die aufgetretene Trübung wird abzentrifugiert und der Überstand abgegossen. Den Bodensatz nimmt man mit 0,3-0,5 ml 0,85% Kochsalzlösung auf. Die resultierende klare Flüssigkeit enthält die gruppenspezifische Substanz in konzentrierter Form. Sie wird zur Präzipitation benutzt.

**Gruppenantiseren:** Wir verwendeten lyophilisierte Seren der Behring-Werke. Das Lyophilisat wird mit 1 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt. Es resultiert eine klare, leicht gelblich gefärbte Flüssigkeit, die so zur Präzipitation verwandt wird.

**Präzipitationstechnik:** Es werden Präzipitationsröhrchen benutzt, die 3 cm lang sind und eine lichte Weite von 1/2 - 1 mm haben. Das Serum wird sodann in 1 ml Pipetten aufgezogen und mit den Präzipitationsröhrchen in Kontakt gebracht. Durch die Kapillarkraft läßt man es 1 cm hochlaufen und befestigt das Röhrchen danach in einem Plastillinblock. Das Serum ist damit in dieser Höhe fixiert. Anschließend wird mit einer Kapillarpipette Lancefield- oder Fuller-Extrakt aufgezogen und vorsichtig über das Antiserum geschichtet.

Bei positiver Reaktion bildet sich nach 1 - 3 min ein scharfer Präzipitationsring, der gegen einen dunklen Hintergrund am besten ablesbar ist.

Um einen geeigneten Stamm für unsere weiteren Versuche zu finden, prüften wir 38 A-Streptokokkenstämme auf ihre Mäusepathogenität und ihr Virulenzverhalten im Verlauf von 20 Tier- und 30 Nährbodenpassagen.

Streptokokken der serologischen Gruppe A Typ 14 und 17 stellten uns freundlicherweise Herr S. S. Barkulis, Direktor der mikrobiologischen Versuchsabteilung der CIBA und das "Streptococcal Reference Laboratory" in London zur Verfügung.

Wir verfahren folgendermaßen: Die Ausgangsstämme wurden in zwei Kultur-reihen geteilt, wobei die eine Reihe fortlaufend über Mäuse- mit dazwischen-geschalteten Nährbodenpassagen gezogen wurde. Die andere Reihe lief fort-während über Nährböden. Zur Kennzeichnung der Virulenz wurde die MLD er-mittelt.

#### a) Virulenzsteigerung

Die Virulenz ist der quantitative Maßstab der pathogenen und infektiösen Er-regereigenschaften gegenüber einem bestimmten Wirt. Das "Virulentwerden" einer Kultur von A-Streptokokken ist hauptsächlich durch die Selektion patho-gener Mutanten und eine adaptive Leistungssteigerung der Keime bedingt. Die einzelnen A-Streptokokkendissoziationsformen haben typische Eigenschaften, die ihr pathogenes Verhalten bestimmen. So zeigen Mucoid- und Matt-Formen eine gewisse Virulenz, während Glossy- und Rough-Formen avirulent sind. Die Virulenz dieser Dissoziationsformen ist aber keine konstante Eigenschaft dieser Keime, denn es können immer wieder hoch- oder schwachvirulente Mutanten abgespalten werden.

Wird nun eine Mischkultur, bestehend aus mehreren Mutanten, in einen Orga-nismus injiziert, so werden Matt- und Mucoid-Formen infolge ihrer wirksame-ren Abwehrmechanismen zur Entwicklung kommen. Die Glossy- und Rough-Formen werden eliminiert, bis Reinkolonien an Matt- oder Mucoid-Formen vorliegen. Eine weitere Virulenzsteigerung ist durch Adaptationsvorgänge be-dingt.

Eine Bestätigung dieser Hypothese bringen Befunde von TODD und LANCE-FIELD (105), die aus menschlichen Krankheitsprozessen nur Matt-Formen iso-lieren konnten.

Oft steigt die Virulenz einer A-Streptokokkenkultur erst im Verlauf vieler Tierpassagen an und läßt bald keine Steigerung mehr zu. Da diese Grenzwerte relativ niedrig sind, kann sie nur auf Grund neuer Abspaltung von Glossy- oder Rough-Formen erklärt werden (TODD und LANCEFIELD, 105).

Ausführung: War ein Stamm so schwach virulent, daß er keine letale Infektion auslöste, dann führten wir indirekte Tierpassagen durch (LEEDOM und BARKULIS, 64).

Indirekte Tierpassagen: Mit einer Öse A-Streptokokken werden 10 ml Todd-Hewitt-Nährboden beimpft. Nach 16-stündiger Bebrütung bei 37°C wuschen wir die Keime, suspendierten sie in 10 ml steriler physiolo-

gischer Kochsalzlösung und injizierten jeder Maus 0,5 ml der Suspension intraperitoneal. Waren die Tiere am nächsten Tag nicht gestorben, so wurden sie getötet, die Milz steril entnommen, in einem sterilen Mörser zerrieben und in 10 ml Todd-Hewitt-Nährboden geimpft. Nach 16-stündiger Bebrütung konnten neue Tiere infiziert werden.

Lösten die Keime bei der ersten Injektion den Tod der Tiere aus, dann führten wir intermittierende Tier-Nährbodenpassagen durch. Die Ausführung entspricht der indirekten Tierpassage, nur wird anstatt der zerriebenen Milz einige Ösen Herzblut zur Beimpfung des nächsten Nährbodens genommen. Diese Methoden haben den Vorzug, eine große Keimmenge zu liefern. Die zwischengeschaltete Nährbodenpassage begünstigt aber Rückmutationen in avirulente Glossy- und Rough-Formen.

Sie kann verhindert werden, indem man direkte Tierpassagen durchführt. Allerdings muß der zu überimpfende Stamm schon einen gewissen Virulenzgrad erreicht haben.

Direkte Tierpassagen: Aus der gestorbenen Maus entnimmt man einige Ösen Herzblut. Diese werden mit steriler physiologischer Kochsalzlösung zu 0,5 ml aufgefüllt und der nächsten Maus intraperitoneal gespritzt. Zur Prüfung der Reinheit wird eine Plattenkultur angelegt.

Bei der Ausführung der Passagen benutzten wir modifizierten Todd-Hewitt-Nährboden, weil er die Bildung der aktiven Proteinase hemmt (ROTHBARD und TODD, 89), deren antagonistische Wirkung zur M-Substanz wir oben beschrieben haben.

Modifizierter Todd-Hewitt-Nährboden: 500 g gemahlenes, fettfreies Pferde- oder Rindfleisch wird mit 1,050 l Aqua dest. versetzt. Den Ansatz läßt man über Nacht im Kühlschrank ziehen. Am nächsten Tag wird es erhitzt und die Temperatur von 85°C eine halbe Stunde gehalten. Dann wird die Fleischbrühe heiß filtriert und folgende Substanzen zugefügt:

2 g NaCl  
2 g NaCO<sub>3</sub>  
1 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O  
2 g Glukose  
20 g Neopepton (Difco).

Nach gutem Durchmischen wird der pH-Wert festgestellt und mit n/1 NaOH auf pH 7 einreguliert. Daraufhin kocht man den Nährboden 15 min lang und filtriert ihn nochmals. An drei aufeinanderfolgenden Tagen wird er fraktioniert sterilisiert.

Die sterile Mäuseblutentnahme, wie sie in unseren Tierpassagen vorgenommen wurde, erfolgt am vorteilhaftesten sofort nach dem Tod der Tiere. Von 15 - 20 g schweren Mäusen gewinnt man durchschnittlich 0,5 - 1,0 ml Blut. Bei längerer Aufbewahrung im Kühlschrank (4°C) konnten wir keine Verunreinigung mit anderen Keimen feststellen, jedoch war die Blutmenge beträchtlich vermindert.

Technik der sterilen Entnahme von Mäuseblut: Das gestorbene Tier wird auf ein Brettchen gespannt und das Fell ohne Verletzung des Thorax auf der ventralen Seite aufgetrennt, abpräpariert und seitlich befestigt. Dann glüht man die keimhaltigen Haare mit der Sparflamme eines Bunsenbrenners ab. Anschließend wird der Thorax eröffnet, Herz und Lunge freigelegt, die Gefäße durchtrennt und die Lunge cranialwärts hochgeklappt. Lunge und Trachea dürfen hierbei nicht verletzt werden, da aus ihnen Keime in den Thorax kommen können. Das Blut sammelt sich in einer Lache im Thoraxraum und kann mit einer Spritze entnommen werden.

#### b) Virulenzabschwächung

Eine Virulenzabschwächung tritt ein, wenn die Selektion pathogener Mutanten und die Anpassung an den Wirt fehlt. Allgemeine Schäden wie Hitze, Nährstoffmangel, Chemotherapeutika, Desinfektionsmittel und die Ansammlung eigener Stoffwechselprodukte vermögen die Virulenz der Keime gleichfalls abzuschwächen.

Sehr einfach kann man die Keime durch Trypsinbehandlung in ihrer Virulenz abschwächen. Dabei wird die M-Substanz der A-Streptokokken entfernt, ohne daß ihre Lebensfähigkeit beeinträchtigt wird. Auch durch Züchtung in homologen Antikörpern ist eine Virulenzabschwächung zu erreichen (TODD und LANCEFIELD, 105).

Ausführung: Wir benutzten einfache Nährbodenpassagen (Blutagar und Bouillon), um die Keime in ihrer Virulenz abzuschwächen. Die fehlende Auslese dürfte hierbei die Hauptursache für die Virulenzabschwächung sein.

Die Stämme wurden jeden Tag von Platte zu Platte (Bouillon zu Bouillon) überimpft. Nach 30 Nährbodenpassagen bestimmten wir die MLD.

#### c) Virulenzmessung

Da es sich lediglich um orientierende Vorversuche handelt, dürfte die Bestimmung der MLD ausreichen.

Ausführung: Mit einer Öse Kolonien der letzten Passage des Nährbodenstammes und drei Ösen Herzblut der zuletzt gestorbenen Maus wurden je 10 ml Todd-Hewitt-Nährboden beimpft. Die Kulturen bebrütet man bei 37°C 18 Std., zentrifugiert sie ab und suspendiert den Bodensatz in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung.

Anschließend wurden Verdünnungsstufen in logarithmischer Reihe angelegt. Hierzu entnimmt man jeder Suspension 1 ml und gibt ihn zu 9 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung (Verdünnung 1 : 10). Auf diese Weise stellten wir Verdünnungsreihen bis 1 : 1000000 her. Von jeder Verdünnung injizierten wir einem Kollektiv von 6 Mäusen 0,5 ml intraperitoneal.

Um uns zu vergewissern, ob in den letzten Verdünnungsstufen noch Keime vorhanden waren, wurde 1 ml der Keimsuspension jeder Verdünnungsstufe auf eine Blutplatte getropft. Bei den höchsten Verdünnungsstufen konnten auf den Blutplatten noch 40 - 80 Kolonien gezählt werden.

#### d) Ergebnisse

Nach 30 Nährboden- bzw. 20 Tierpassagen waren von 38 A-Streptokokkenstämmen 36 virulent und 2 avirulent.

Bei den avirulenten Stämmen ließ sich mit keiner der besprochenen Methoden eine Mäusepathogenität erzielen.

Die mäusepathogenen Stämme zeigten jedoch eine unterschiedliche Virulenz. Die zur letalen Infektion nötige Keimmenge wurde im Verlauf der Tierpassagen geringer.

Die Infektionsauslösung ließ sich bei 16 der verwandten Stämme bis zu Verdünnungen von 1 : 1000 steigern, während 14 Stämme nach der 8. Tierpassage konstant mit 1 : 100 letal infizierten. Bei einigen Stämmen traten im Verlauf der Tierpassagen Rückschläge ein, d.h. sie lösten letale Infektionen nur noch bei Verdünnungen von 1 : 10 aus. Eine weitere Virulenzsteigerung über 1 : 1000 - gemessen mit der MLD - ließ sich nur bei A-Streptokokken Typ 14 und 17 erzielen.

Die Ergebnisse für diese beiden Stämme sind in der folgenden Tabelle aufgezeichnet:

Tabelle 3

| Zahl der Passagen<br>Verdünnungsstufen | A-Streptokokken |   |        |   |
|----------------------------------------|-----------------|---|--------|---|
|                                        | Typ 14          |   | Typ 17 |   |
|                                        | A               | B | A      | B |
| Tierpassage Nr. 0 (A)                  |                 |   |        |   |
| Nährbodenpassage Nr. 0 (B)             |                 |   |        |   |
| unverdünnt                             | +               | + | +      | + |
| 1 : 10                                 | +               | + | +      | + |
| 1 : 100                                | +               | + | -      | - |
| 1 : 1000                               | -               | - | -      | - |
| 1 : 10000                              | -               | - | -      | - |
| 1 : 100000                             | -               | - | -      | - |
| 1 : 1000000                            | -               | - | -      | - |
|                                        |                 |   |        |   |
| Tierpassage Nr. 20 (A)                 |                 |   |        |   |
| Nährbodenpassage Nr. 30 (B)            |                 |   |        |   |
| unverdünnt                             | +               | + | +      | + |
| 1 : 10                                 | +               | - | +      | + |
| 1 : 100                                | +               | - | +      | - |
| 1 : 1000                               | +               | - | +      | - |
| 1 : 10000                              | +               | - | -      | - |
| 1 : 100000                             | +               | - | -      | - |
| 1 : 1000000                            | -               | - | -      | - |

Tabelle 3: MLD der A-Streptokokkenstämme Typ 14 und 17

Für die Nährbodenpassagen konnten wir folgendes feststellen:

Bei allen Stämmen war eine Virulenzabschwächung zu bemerken. Bei dem A-Streptokokkenstamm Typ 14 war die anfängliche MLD die 1 : 100 verdünnte Kultur. Nach der 30. Passage konnte nur noch mit unverdünnter Kultur eine letale Infektion ausgelöst werden.

Unsere Versuche haben zwei A-Streptokokkenstämme Typ 14 und 17 herausgefunden, die sich in ihrer Virulenz gut steigern bzw. abschwächen lassen. Die weiteren Versuche wurden daher mit diesen Streptokokkenstämmen ausgeführt.

Die Tierpassagen wurden weiterhin über laufende direkte Mäusepassagen virulent gehalten. Die Nährbodenpassagestämme wurden täglich auf einen neuen Nährboden weitergeimpft.

## II. HERSTELLUNG DER ANTI-M-SEREN

Mit der vorigen Versuchsreihe hatten wir zwei A-Streptokokkenstämme Typ 14 und Typ 17 herausgefunden, die sowohl in hoch- als auch in schwach-virulenter Form vorlagen. Sie dienten zur Herstellung spezifischer Antiseren.

Hierzu wurde folgendermaßen verfahren: Aus jedem der vier Stämme wurde eine Vaccine hergestellt, womit wir drei Kaninchen immunisierten. Nach acht Wochen entbluteten wir die Tiere und bereiteten das gewonnene Blut auf. Anschließend wurden die Seren absorbiert und ihr Antikörpertiter bestimmt.

### a) Auswahl der Immunisierungstiere

Wir wählten Kaninchen, da sie gute Antikörperbildner sind. Sie wogen durchschnittlich 2,5 - 3 kg. Junge und leichte Tiere können wir nicht empfehlen, da uns zwei Kaninchen von 1,7 und 1,9 kg während der Immunisierung eingingen. Sie bekamen in der 3. Woche Fieber, verweigerten die Nahrungsaufnahme und konnten auch durch Absetzen der Vaccinierung nicht mehr gerettet werden. Alle anderen Tiere zeigten während der Immunisierungszeit keine Beeinträchtigung ihres Befindens.

### b) Herstellung der Vaccine

Da die Antikörper M-spezifisch sind, stehen uns verschiedene Methoden zur Verfügung:

#### 1. Vaccine aus ganzen Streptokokkenzellen:

Sie ist einfach in der Herstellung und erzeugt in 6-8 Wochen gute Antiseren.

#### 2. Vaccine aus Streptokokkenzellwänden:

Die M-Substanz kann nach Zerstörung der Zellen in deren Wänden nachgewiesen werden. Die Herstellung der Streptokokkenzellwandvaccine ist umständlicher. Außerdem erzeugt sie bei gleicher Immunisierungsdauer geringere Antikörpermengen als eine Vaccine aus ganzen Streptokokkenzellen (BARKULIS, 3).

#### 3. Vaccine aus gereinigter M-Substanz:

Die Herstellung der gereinigten M-Substanz erfordert einen großen materiellen und technischen Aufwand. Zudem wirkt die gereinigte M-Substanz nur eine Woche als Antigen (LANCEFIELD, 56).

Da nach Befunden vieler Autoren (LANCEFIELD, 55; COBURN und PAULI, 10; MAXTED, 76) die Vaccine aus ganzen Streptokokkenzellen gute Antikörpertiter erzeugt, verwandten wir diese Methode.

**Ausführung:** Die A-Streptokokken werden in 100 ml Todd-Hewitt-Nährboden geimpft und 18 Std. bei 37°C bebrütet. Dann legt man Plattenkulturen als Reinheitskontrolle an. Anschließend werden die Keime 4-mal in steriler, physiologischer Kochsalzlösung gewaschen und in 100 ml steriler Phosphatpufferlösung resuspendiert. Durch 1/2-stündiges Erhitzen in einem Wasserbad von 58°C tötet man die Keime ab. Anschließend läßt man den Ansatz abkühlen und zentrifugiert ihn. Dann gibt man den Bodensatz in 10 ml 0,9% sterile Kochsalzlösung. Zu der fertigen Vaccine gibt man zum Schutz vor Verunreinigung meist noch Merthiolat in einer Endkonzentration von 1:1000 hinzu.

Die Vaccine der vier Stämme wurde nephelometrisch auf gleiche Dichte eingestellt. Jede Woche bereiteten wir eine frische Vaccine, die für die 2. und 3. Injektion im Kühlschrank bei +4°C aufbewahrt wurde. Vor jeder Einspritzung wuschen wir die Keime nochmals mit steriler physiologischer Kochsalzlösung und brachten sie auf Zimmertemperatur.

### c) Immunisierung

Die Immunisierungsverfahren beginnen meist mit einer niedrigen Sensibilisierungsdosis, dann folgt die Injektion steigender Dosen abgetöteter Streptokokken. Zuletzt setzt man der Vaccine oft geringe Mengen lebender Keime zu.

Die Herstellung der "Lebend-Vaccine" erfolgt nach dem oben beschriebenen Verfahren, nur werden die Keime nicht abgetötet und kein Merthiolat zugesetzt. Sie muß für jede Injektion frisch bereitet werden.

Die Immunisierung erfolgte nach einer modifizierten Methode von LANCEFIELD (55) sowie COBURN und PAULI (10). Sie ist in der nachfolgenden Tabelle angegeben.

Tabelle 4

|          |        |                                            |   |
|----------|--------|--------------------------------------------|---|
| 1. Woche | 1. Tag | 0,5 ml i.v.                                |   |
| 2. Woche | 1. Tag | 0,5 ml i.v.                                |   |
| 2. Woche | 2. Tag | 0,5 ml i.v.                                |   |
| 2. Woche | 3. Tag | 1,0 ml i.v.                                |   |
| 3. Woche | 1. Tag | 1,0 ml i.v.                                |   |
| 3. Woche | 2. Tag | 1,0 ml i.v.                                |   |
| 3. Woche | 3. Tag | 2,0 ml i.v.                                |   |
| 4. Woche | 1. Tag | 2,0 ml i.v.                                |   |
| 4. Woche | 2. Tag | 2,0 ml i.v.                                |   |
| 4. Woche | 3. Tag | 2,0 ml i.v. + 0,1 ml "Lebend-<br>Vaccines" |   |
| 5. Woche | 1. Tag | 3,0 ml i.v. + 0,2 ml                       | " |
| 5. Woche | 2. Tag | 3,0 ml i.v. + 0,2 ml                       | " |
| 5. Woche | 3. Tag | 3,0 ml i.v. + 0,2 ml                       | " |

Tabelle 4: Immunisierungsplan

Die Kaninchen wurden nach dem oben angegebenen Plan an drei aufeinanderfolgenden Tagen vacciniert und ruhten die restlichen Tage. In der 6., 7. und 8. Woche wurden die gleichen Dosen wie in der 5. Woche gegeben.

Die Injektionen führten wir folgendermaßen aus: Ein Kaninchenohr wurde an der lateralen Seite mit Xylol eingerieben. Hierdurch traten die Venen hervor. Dann entfernten wir die Haare mit einer scharfen Rasierklinge und rieben die rasierte Stelle mit Aethylalkohol ab. Zunächst injizierten wir in die ohrspitzenwärts gelegenen Teile der Vene, um einen evtl. proximalen Venenverschluß zu vermeiden. Nach jeder Injektion wechselten wir das Ohr.

#### d) Blutentnahme

Nach 5-6-wöchiger Immunisierung wurde das Testblut entnommen. Wir bereiteten es auf und stellten seinen Antikörpertiter fest. War er ausreichend, so wurde das Tier entblutet.

Ausführung: Das Kaninchenohr wurde rasiert, mit Aethylalkohol abgerieben und mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Um eine Hämolyse zu vermeiden, wurden auch Spritzen, Kanülen und Behälter mit steriler Phosphat-

pufferlösung von pH 7 gespült. Anschließend punktierten wir die Ohrvene an und entnahmen etwa 6 ml Blut. Dieses füllten wir in ein Zentrifugenglas und ließen es über Nacht im Kühlschrank bei +4°C stehen. Meistens hatte sich am nächsten Tag Serum und Blutkuchen getrennt. Es konnte dann abgehoben und absorbiert werden. War keine Abscheidung eingetreten, so wurde das Blut mit 1000 U/min zentrifugiert.

Nach sorgfältiger Reinigung des Ohres kann man auch die Vene anstechen und das Blut abtropfen lassen. Die Hämolysegefahr ist hierbei geringer, die Verunreinigung mit Keimen (*Escherichia coli*) aber wesentlich häufiger.

Wird bei der Testblutentnahme ein ausreichender Antikörpertiter festgestellt, so kann man die Kaninchen entbluten. Dies kann durch Herzpunktion, durch Punktion der Ohrvenen oder durch Aufschneiden der Carotiden erreicht werden.

Wir entbluteten die Tiere durch die Carotiden. Hierzu wurden die Kaninchen getötet, das Fell am Halsteil eröffnet und auseinandergezogen, die Carotiden quer durchtrennt und das Blut in einem 200 ml Zentrifugenglas aufgefangen. Anschließend bereiteten wir das Blut auf und absorbierten das gewonnene Serum.

#### e) Absorption

Das Serum enthält neben typenspezifischen noch Antikörper gegen andere Streptokokkensubstanzen, insbesondere die gegen das gruppenspezifische C-Polysaccharid. Diese unerwünschten Antikörper werden entfernt, indem man das Serum mit einem heterologen Stamm der gleichen Gruppe absorbiert. Treten nach der Erstabsorption noch Kreuzreaktionen mit einem heterologen Typ auf, dann wiederholt man die Absorption mit diesem Typ.

Die A-Streptokokken eignen sich nicht gleichermaßen zur Absorption. MAXTED (76) erzielte die besten Erfolge mit den Typen 6, 11, 3, 18, 31, 36. Wir verwandten deshalb immer A-Streptokokken Typ 6 zur Erstabsorption.

Ausführung: In 5 Todd-Hewitt-Nährboden impften wir eine Reinkultur von Streptokokken der Gruppe A Typ 6. Der Ansatz wurde 48 Std. bei 37°C bebrütet. Dann prüften wir die Reinheit mit einer Blutplattenkultur. Anschließend wuschen wir die Keime 4 mal und suspendierten sie in 500 ml Phosphatpufferlösung von pH 7, 8. Durch 1/2-stündiges Erhitzen auf 58°C wurden die Keime abgetötet und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Der Absorptionsansatz wurde vor der Verwendung noch 2-3 mal gewaschen und 1 Std. gekocht.

Dann führten wir die Absorption aus. Hierzu pöckten wir die Streptokokken durch scharfes Zentrifugieren. Dann setzten wir zu einem Volumen des Bodensatzes 3 Volumen Serum hinzu und mischten gut durch. Anschließend wurde dieser Ansatz in einem Wasserbad von  $37^{\circ}\text{C}$   $1/2 - 1$  Std. inkubiert. Zuletzt zentrifugierten wir bei 3000 U/min und hoben das absorbierte Serum ab. Das absorbierte Serum testeten wir gegen die uns zur Verfügung stehenden A-Streptokokkentypen (1, 3, 5, 11, 14 und 17). Hierbei konnten keine Kreuzreaktionen nachgewiesen werden.

#### f) Bestimmung des Antikörpertiters

Den Antikörpergehalt eines Serums kann man auf verschiedene Weise prüfen. Hierzu stehen uns folgende Methoden zur Verfügung.

##### 1. Mäuseschutztest:

Spezifische Antikörper schützen Mäuse gegen Infektionen mit homologen virulenten A-Streptokokken. Die Methode erlaubt nur einen Rückschluß auf die Anwesenheit von Antikörpern, aber keine exakte Mengenbestimmung.

##### 2. Bakteriostatischer Test:

Die Mikroorganismen haben bei Anwesenheit homologer Antikörper eine höhere Empfindlichkeit gegen Mäusephagocyten. Der Test gestattet ebenfalls nur eine annähernde quantitative Antikörperbestimmung.

##### 3. Quantitativer Präzipitationstest (SCHMIDT, 96):

Hierbei kann der Antikörpergehalt eines Serums exakt bestimmt werden.

Da es uns lediglich auf einen ausreichenden und konstanten Antikörpergehalt ankam, genügte eine Messung mit der Ringpräzipitation. Hierbei wurde eine konstante Antigenbereitung gesichert, und das Serum verdünnt. Ergeben sich positive Reaktionen bis zu Antikörperverdünnungen von 1 : 6, so war der Titer ausreichend.

#### g) Ergebnisse

Das Ergebnis dieser Versuchsreihe ist in Tabelle 5 zusammengestellt. Bei allen Tieren benötigten wir eine 6-wöchige Immunisierungsdauer.

Tabelle 5

| Immunisierung mit<br>A-Streptokokken | Kaninchen-<br>zahl | Serum-<br>Menge | M-Antikörper-<br>endtiter |
|--------------------------------------|--------------------|-----------------|---------------------------|
| Typ 14                               | 1                  | 53 ml           | 1 : 6                     |
| hochvirulent                         | 1                  | 60 ml           | 1 : 8                     |
|                                      | 1                  | 66 ml           | 1 : 8                     |
| Typ 14                               | 1                  | 62 ml           | 1 : 2                     |
| schwachvirulent                      | 1                  | 46 ml           | 1 : 1                     |
|                                      | 1                  | 72 ml           | 1 : 1                     |
| Typ 17                               | 1                  | 48 ml           | 1 : 4                     |
| hochvirulent                         | 1                  | 62 ml           | 1 : 8                     |
|                                      | 1+                 | -               | -                         |
| Typ 17                               | 1                  | 74 ml           | 1 : 2                     |
| schwachvirulent                      | 1                  | 56 ml           | 1 : 2                     |
|                                      | 1+                 | -               | -                         |

Tabelle 5: Antikörpertiter nach Immunisierung mit hochvirulenten und schwachvirulenten A-Streptokokkenmutanten

Die Betrachtung der Tabelle läßt für die hoch-virulenten Stämme folgendes erkennen:

Beide Typen zeigen hohe Antikörpertiter, die aber bei den einzelnen Tieren unterschiedlich sind. Die schwach-virulenten Stämme erzeugen durchschnittlich niedrigere Antikörpertiter, die ebenfalls für jedes Tier verschieden sind. Der Zweck unseres Versuches war, ein gutes Antiserum herzustellen. Da das des Typs 14 den höchsten Antikörpertiter aufwies, wurden alle folgenden Versuche mit ihm ausgeführt.

### III. VIRULENZGRAD UND TITERBESTIMMUNGEN DER M-SUBSTANZ

Mit den vorherigen Versuchen hatten wir sowohl verschieden virulente A-Streptokokken Typ 14 als auch spezifische Anti-M-Seren erhalten. Der Tierpassagestamm wird nachfolgend mit Stamm A, der 1. Plattenpassagestamm mit Stamm B und der 2. Plattenpassagestamm mit Stamm C bezeichnet.

Bevor wir die Untersuchungen über die Relation zwischen Virulenzgrad und

serologischer Reaktivität der M-Substanz des entsprechenden Stammes anstellen konnten, galt es, die Virulenz zu bestimmen und die M-Substanz zu isolieren. Anschließend wurde die serologische Reaktivität der M-Substanz eines jeden Stammes gegen ein konstant-titerndes Antiserum von A-Streptokokken Typ 14 festgestellt. Die serologische Reaktivität bezogen wir hierbei auf den M-Proteingehalt/ml.

#### a) Bestimmung des Virulenzgrades

Bei der Bestimmung des Virulenzgrades einer Bakterienkultur am tierischen Organismus kann man den Tieren abfallende Keimengen injizieren und den Todeseintritt, bezogen auf die inokulierte Keimmenge, feststellen. Der Grenzwert, d.h. die kleinste Keimmenge, die gerade noch den Tod der Tiere auslöst, gibt Aufschluß über die Virulenz gegenüber einem bestimmten Testorganismus (MLD). Diese Methode gestattet aber in höheren Verdünnungen keine exakte Grenzwertfestlegung mehr (z.B. zwischen 1:10000 und 1:100000). Deshalb stellten wir den Virulenzgrad mit der LD<sub>50</sub> nach dem Verfahren von REED und MUENCH (88) fest, wobei der Endpunkt in dem Bereich bestimmt wird, in dem 50% der Tiere ad exitum kommen.

LD<sub>50</sub> nach REED und MUENCH (88): In einer Tabelle gibt man in der ersten Spalte die Keimverdünnungen an und fügt die Zahl der bei dieser Verdünnung lebenden und gestorbenen Tiere hinzu (Reihe a, b und c).

Da man annehmen kann, daß ein Tier, welches bei einer bestimmten Keimverdünnung stirbt, auch bei einer niedrigeren sterben würde, kann man die Anzahl der gestorbenen Tiere jeder Keimverdünnung hinzufügen. Umgekehrt wird ein Tier, das eine bestimmte Keimverdünnung überlebt, auch eine höhere Verdünnung überleben. Diese beiden Werte ergeben nach REED und MUENCH (88) die Reihen d und e. Aus der Differenz beider kann nun die Mortalität in Prozenten errechnet werden.

Erhält man dann eine Absterberate, die zwischen 1:1000 und 1:100 liegt, so wird zur genauen Ermittlung der proportionalen Distanz die Mortalität der niedrigeren und höheren Keimverdünnung, die vom 50%-Wert differieren, mit folgender Formel errechnet:

$$\frac{50\% - A}{B - A} = \text{Proportionale Distanz}$$

A = Mortalität der nächsthöheren Keimverdünnung in Prozent

B = Mortalität der nächstniedrigeren Keimverdünnung in Prozent

Die Keimverdünnungen werden meist in logarithmischer Reihenfolge angelegt. Zur Endausrechnung müssen dann die Ergebnisse logarithmiert werden und vom Logarithmus der höheren Keimverdünnung der Wert der proportionalen Distanz mal Verdünnungsfaktor abgezogen werden. Das Resultat ist der Logarithmus der  $LD_{50}$ .

Ausführung: Je 50 ml eines Todd-Hewitt-Nährbodens (pH 7,4) wurden mit 3 Ösen der beiden Plattenpassagestämmen (Stamm B und C) von A-Streptokokken Typ 14 aus zwei 18-Std. bebrüteten Bouillonkulturen beimpft. Ebenso beimpften wir 50 ml eines gleichen Todd-Hewitt-Nährbodens mit dem Tierpassagestamm von A-Streptokokken Typ 14 (Stamm A). Hierbei erfolgte die Beimpfung mit 3 Ösen Herzblut einer frisch gestorbenen Passagemaus. Alle Kulturen wurden 8 Std. bebrütet und anschließend in 10 l - Beträge von Todd-Hewitt-Nährboden gegeben. Nach 18-stündiger Bebrütung entnahmen wir jeder Kultur 10 ml und zentrifugierten sie ab. Dann wurden die gewonnenen Keime 4 mal gewaschen und in 3 Reagenzröhrchen in steriler physiologischer Kochsalzlösung resuspendiert. Anschließend stellten wir die drei Keimsuspensionen nephelometrisch auf gleiche Dichte ein und entnahmen nach kräftigem Durchschütteln aus jeder der drei Kulturen 1 ml und gaben diesen in 9 ml sterile physiologische NaCl-Lösung (Verdünnung 1 : 10).

Von diesem Ansatz wurde nach gutem Durchmischen wieder 1 ml entnommen und erneut mit 9 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung versetzt (Verdünnung 1 : 100) und laufend fort, bis für die drei Stämme folgende Verdünnungsstufen erreicht waren: unverdünnt, 1 : 10, 1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10 000, 1 : 100 000, 1 : 1 000 000. Es wurde dann von jeder Verdünnungsstufe 0,5 ml einer Maus intraperitoneal injiziert.

Um uns zu vergewissern, ob in jeder Verdünnungsstufe noch Keime vorhanden waren, wurde von jeder Verdünnungsstufe 0,5 ml entnommen und auf einer Blutplatte ausgestrichen. Von der höchsten Verdünnungsstufe, nämlich 1 : 1 000 000, wuchsen 20 - 30 Kolonien.

Ergebnisse: Die Berechnung (nach REED und MUENCH, 88) und die Ergebnisse für die Stämme A, B und C sind in den Tabellen 6, 7 und 8 angegeben.

Tabelle 6

| Keimverdünnung | leben | tot | Gesamtzahl |     | Prozent der |
|----------------|-------|-----|------------|-----|-------------|
|                |       |     | leben      | tot | Mortalität  |
| a              | b     | c   | d          | e   | f           |
| unverdünnt     | o     | 6   | o          | 87  | 100 %       |
| 1 : 10         | o     | 10  | o          | 81  | 100 %       |
| 1 : 100        | o     | 10  | o          | 71  | 100 %       |
| 1 : 1000       | o     | 20  | o          | 61  | 100 %       |
| 1 : 10 000     | o     | 20  | o          | 41  | 100 %       |
| 1 : 100 000    | 8     | 12  | 8          | 21  | 72,41 %     |
| 1 : 1 000 000  | 11    | 9   | 19         | 9   | 32,14 %     |

Tabelle 6: Zusammenstellung nach REED und MUENCH (88) für Stamm A nach 66 Tierpassagen (46 indirekte Mäusepassagen und 20 direkte Mäusepassagen)

Die LD<sub>50</sub> des Stammes A betrug 1 : 360 600.

Tabelle 7

| Keimverdünnung | leben | tot | Gesamtzahl |     | Prozent der |
|----------------|-------|-----|------------|-----|-------------|
|                |       |     | leben      | tot | Mortalität  |
| a              | b     | c   | d          | e   | f           |
| unverdünnt     | o     | 6   | o          | 16  | 100 %       |
| 1 : 10         | 2     | 8   | 2          | 10  | 83,3 %      |
| 1 : 100        | 8     | 2   | 10         | 2   | 16,6 %      |
| 1 : 1000       | 20    | o   | 30         | 0   | 0 %         |
| 1 : 10 000     | 20    | o   | 50         | o   | 0 %         |
| 1 : 100 000    | 20    | o   | 70         | o   | 0 %         |
| 1 : 1 000 000  | 20    | o   | 90         | o   | 0 %         |

Tabelle 7: Zusammenstellung nach REED und MUENCH (88) für Stamm B nach 142 Plattenpassagen (bzw. Bouillonpassagen)

Die LD<sub>50</sub> für Stamm B betrug 1 : 3,16.

Tabelle 8

| Keimverdünnung | leben tot |      | Gesamtzahl |       | Prozent der Mortalität |
|----------------|-----------|------|------------|-------|------------------------|
|                | a         | b c  | leben d    | tot e |                        |
| unverdünnt     |           | 6 0  | 6          | 0     | 0 %                    |
| 1 : 10         |           | 10 0 | 16         | 0     | 0 %                    |
| 1 : 100        |           | 10 0 | 26         | 0     | 0 %                    |
| 1 : 1000       |           | 20 0 | 46         | 0     | 0 %                    |
| 1 : 10 000     |           | 20 0 | 66         | 0     | 0 %                    |
| 1 : 100 000    |           | 20 0 | 86         | 0     | 0 %                    |
| 1 : 1 000 000  |           | 20 0 | 106        | 0     | 0 %                    |

Tabelle 8: Zusammenstellung nach REED und MUENCH (88) für Stamm C nach 242 Plattenpassagen (bzw. Bouillonpassagen)

Der Stamm C war vollkommen avirulent.

Die Tabellen zeigen, daß wir drei A-Streptokokkenstämme des Typs 14 mit deutlich unterscheidbarem Virulenzverhalten herausgezüchtet hatten: Stamm A mit einer  $LD_{50}$  von 1 : 360 600, Stamm B mit einer  $LD_{50}$  von 1 : 3,6 und den avirulenten Stamm C. Der avirulente Stamm konnte durch 100 indirekte Tierpassagen nicht mehr in seiner Virulenz gesteigert werden. Anschließend isolierten wir aus jedem Stamm die M-Substanz.

#### b) Darstellung der M-Substanz

Zur Gewinnung der M-Substanz sind zwei Schritte erforderlich: die Extraktion und die Reinigung.

Die Säurehydrolyse nach LANCEFIELD (43, 45) ist die bevorzugte Methode, da alle Versuche, die M-Substanz durch einen schonenderen Prozeß zu gewinnen, vergeblich waren (LANCEFIELD und PERLMANN, 56). Kürzlich ist ein Verfahren mit phagenassoziiertem Lysin beschrieben worden, das ausreichende M-Präparationen gestatten soll (LANCEFIELD, 62).

**Extraktherstellung:** Eine 18-stündige Kultur wird mehrmals in steri-  
ler physiologischer Kochsalzlösung gewaschen. Dann werden die A-Strepto-  
kokken in ein kleines Volumen physiologischer NaCl-Lösung gebracht und  
mit n/20 HCl auf pH 2 - 2,4 eingestellt. Diese Suspension wird 10 - 12 min  
in einem kochenden Wasserbad erhitzt, dann abgekühlt und zentrifugiert.

Den Überstand gießt man ab und neutralisiert ihn mit  $n/20$  NaOH.

Der Rohextrakt enthält neben der M-Substanz hauptsächlich C-Polysaccharide und Nukleoproteine. Um sie zu entfernen, sind verschiedene Methoden angegeben. Die größte Bedeutung hat heute die M-Substanzreinigung nach LANCEFIELD und PERLMANN (56).

#### Antigenreinigung:

1. Der Rohextrakt wird mit dem 3-4-fachen Volumen unvergälltem 95% Äthylalkohol versetzt. Hierbei fällt ein großer Teil der Nukleoproteine aus.
2. RANTZ und RANDALL (87) schlagen vor, den Extrakt mit 3 Volumina 95% Äthylalkohol zu präzipitieren, und den Niederschlag mit einem kleinen Volumen 0,85% NaCl-Lösung aufzunehmen. Dann soll 1 Volumen 95% Äthylalkohol zugesetzt werden. Das abzentrifugierte Präzipitat wird anschließend verworfen. Die 2 restlichen Volumen Alkohol kommen zum Überstand und ergeben das Endpräzipitat.
3. Antigenreinigung nach LANCEFIELD und PERLMANN (56):  
Der Rohextrakt wird mit 3 Volumen 95% Äthylalkohol bei  $+4^{\circ}\text{C}$  präzipitiert und der Niederschlag mit einer kleinen Menge Phosphatpufferlösung aufgenommen. Dann filtriert man ihn durch einen Porzellanbakterienfilter und bringt das gewonnene Produkt bei Zimmertemperatur mit 6N HCl auf pH 2,0. Das gewonnene Präzipitat wird erneut in einem kleinen Volumen Phosphatpufferlösung von pH 8 suspendiert und proteasefreie Ribonuklease in einer Endkonzentration von 0,001 mg/ml zugesetzt. Diesen Ansatz dialysiert man bei  $37^{\circ}\text{C}$  gegen m/100 Phosphatpufferlösung. Nach 5-stündiger Verdauung setzt man die Dialyse für einige Tage gegen größere Volumen m/100 Phosphatpufferlösung fort. Hierdurch werden die Verdauungsprodukte entfernt. Zuletzt wird der Extrakt mit Ammoniumsulfat fraktioniert präzipitiert. Die Hauptmenge der M-Substanz fällt bei einer Sättigung von 33 - 66% aus. Das gewonnene Produkt kann nach salzfreier Dialyse eingefroren und aufbewahrt werden.
4. Nach FOX und KRAMPITZ (24) soll durch Reinigung am Kationenaustauscher ein hochwertiges M-Antigen erzielt werden. Sie absorbierten hierzu die nach LANCEFIELD und PERLMANN (56) erhaltene M-Substanz an ein Kunstharz und eluierten sie unter konstanten Bedingungen mit Phosphatpufferlösung von pH 8. Das gewonnene M-Antigen reagierte mit Antiseren noch bei Verdünnungen von 0,006 mg/ml.

Die beiden ersten Verfahren sind bestenfalls eine Grobreinigung, denn das

Antigen enthält noch einen großen Teil der Nukleoproteine. Sie lösen sogar in höheren Antigenverdünnungen noch Kreuzreaktionen aus.

Das LANCEFIELD'sche Verfahren (56) ist die Standardmethode, denn mit ihm können C-Polysaccharide und Nukleoproteine vollkommen entfernt werden. Erstaunlicherweise treten bei hohen Antigenkonzentrationen trotzdem Kreuzreaktionen mit anderen A-Streptokokkentypen auf. Die Ursache sollen nach LANCEFIELD und PERLMANN (56) M-substanzähnliche Proteine sein, die auch in der Elektrophorese mit der M-Fraktion wandern und gleichermaßen vom Trypsin angegriffen werden.

Ob die unspezifischen Proteine mit dem Kationenaustauscher abgetrennt werden können, ist aus dem uns zur Verfügung stehenden Schrifttum nicht ersichtlich. Die Angaben über die Endtiter sind unzureichend, da der Antikörpergehalt der Seren unbekannt ist.

Ausführung: Um die Virulenzbestimmung gleichzeitig mit der M-Extraktion durchzuführen, hatten wir von den drei A-Streptokokkenstämmen Typ 14 10 l-Beträge von Todd-Hewitt-Nährboden angesetzt, wovon wir 10 ml zur Testung der Virulenz entnahmen. Die restlichen 9990 ml dienten zur Extraktion der M-Substanz.

Hierzu wurden die Keime nach 18-stündiger Bebrütung bei 37°C abzentrifugiert und 4 mal in steriler physiologischer NaCl-Lösung abgewaschen. Anschließend resuspendierten wir die A-Streptokokken in 5000 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung und stellten sie nephelometrisch auf gleiche Dichte ein.

Von jedem der drei nach obigem Verfahren eingestellten Keimsuspensionen wurden gleiche Volumen abzentrifugiert und erneut in 500 ml steriler physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. Dem Ansatz fügten wir nun 6n HCl zu, bis sich ein pH von 2,0 einstellte. Dann wurde er erhitzt und 12 min bei einer Temperatur von 100°C gehalten. Nach Abzentrifugieren und Abkühlen hoben wir den Überstand ab und neutralisierten ihn mit 6n NaOH.

Die Extraktion wurde wiederholt, bis der Extrakt keine Präzipitation mehr mit spezifischem 14 M-Antiserum auslöste (5 mal). Anschließend mischten wir die Extrakte.

Zur Reinigung der gewonnenen M-Substanz versetzten wir diesen Rohextrakt mit 3 Volumen 95% Äthylalkohol und lösten das Präzipitat jeden Ansatzes wieder in 100 ml Phosphatpufferlösung von pH 7,8 (Sörensen). Diese Lösung filtrierten wir dann durch einen Porzellanbakterienfilter und präzipitierten das Filtrat erneut, indem wir es auf pH 2 brachten. Anschließend lösten wir

es in 50 ml Phosphatpufferlösung (pH 7,8) und setzten 0,05 mg proteasefreie Ribonuklease (= 0,001 mg/ml) zu. Den Ansatz füllten wir in Dialysierschläuche (Firma "Kalle") und gaben ihn in 10 l Phosphatpufferlösung, wobei die Nukleinsäuren 5 Std. bei 37°C verdaut wurden. Anschließend setzten wir die Dialyse für 4 Tage fort. Hierzu wurde der Extrakt in jeweils 20 l m/100 Phosphatpufferlösung gebracht und die Flüssigkeit täglich erneuert. Am 5. Tag entnahmen wir den dialysierten Extrakt und präzipitierten ihn mit Ammoniumsulfat. Dazu sättigten wir zunächst 5 l Aqua dest. mit Ammoniumsulfat und setzten dann soviel Ammoniumsulfatlösung zum Extrakt, bis eine Sättigung von 70% erreicht war. Das gewonnene Präzipitat lösten wir nach Abzentrifugieren in 25 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung und verwandten es zur Präzipitation.

**Ergebnis:** Mit diesem Versuch hatten wir die gereinigte M-Substanz der drei verschieden virulenten A-Streptokokkenstämme des Typs 14 erhalten. Diese wurden anschließend zur Prüfung der serologischen Reaktivität verwandt.

#### c) Prüfung der serologischen Reaktivität

Die M-Substanz der Stämme A, B und C konnte nun auf ihre serologische Reaktivität gegenüber einem konstant titernden Antiserum des A-Streptokokkenstammes Typ 14 geprüft werden.

Zur Titerbestimmung kann man sowohl die Präzipitation als auch die Agglutination benutzen. Da die gewonnene M-Substanz ein kolloidal gelöstes Antigen ist, kommt nur die spezifische Präzipitation in Frage. Ihre Grundlage ist eine Affinität zwischen Antigen und homologem Antikörper. Werden beide in vitro zusammengebracht, so verläuft zwischen ihnen eine Reaktion, die entweder durch Aggregierung der Antigen-Antikörperkomplexe oder durch weitere chemische Bindung die Bildung eines sichtbaren Präzipitates veranlaßt. Die neuen Verbände flocken aus und sedimentieren.

Auf das Antigen-Antikörpersystem wirken eine Reihe unspezifischer Faktoren, die eine Ausflockung ohne Immunkörper verursachen können. Der pH-Wert und die Salzionenkonzentration sind jedoch unter normalen Bedingungen bei der serologischen Reaktion (pH 7; NaCl = 0,85%) nur geringgradig wirksam. Eine Temperatursteigerung bewirkt eine Beschleunigung; überhöhte Temperaturen eine Denaturierung der Reaktanten. Da unsere Versuche bei Zimmertemperatur (+ 20 - 23°C) und +4°C ausgeführt wurden, hat sie ebenfalls keinen wesentlichen Einfluß auf den Reaktionsverlauf.

Nach SCHMIDT (94) stehen uns zur Ausführung der spezifischen Präzipitation folgende Methoden zur Verfügung:

1. Eine konstante Menge Antikörper wird mit dem gleichen Volumen steigender Antigenverdünnungen versetzt. Die Bewertung erfolgt auf Grund des Trübungsgrades anhand des ausgeschleuderten Präzipitatstickstoffes.
2. Eine konstante Menge Antigen wird mit dem gleichen Volumen steigender Antikörperverdünnungen versetzt (hauptsächlich gebraucht bei der Agglutination).
3. Die Ringpräzipitation, bei der meist der Antikörper konstant gehalten und das spezifisch leichtere Antigen überschichtet wird.

Die "halbquantitative" Ringpräzipitation gestattet zwar keine genauen Mengenbestimmungen mehr, gibt aber einen Anhaltspunkt über das "Vorhandensein" von Antigen.

Da wir nur feststellen wollten, ob das M-Antigen eines hoch-virulenten Stammes eine höhere serologische Reaktivität aufweist, als das eines schwach-virulenten Stammes und außerdem der Stickstoffgehalt des M-Extraktes bestimmt wurde, genügt diese Methode. Nachteilig ist, daß nur kleine Mengen benutzt werden und Antigen und Antikörper sich nur an den Grenzflächen berühren.

Ausführung: 25 ml des Extraktes (gereinigte M-Substanz) der Stämme A, B und C wurden in zwei Reihen geteilt. Dabei dienten 9 ml immer zur Stickstoffbestimmung im Mikrokjeldahl und 14 ml zur Feststellung der serologischen Reaktivität.

Zur Stickstoffbestimmung im Mikrokjeldahl teilten wir den Extrakt in drei gleiche Volumen und bestimmten deren N-Gehalt. Auf Grund dieses Ergebnisses errechneten wir den Mittelwert des M-Proteingehaltes pro ml.

Hierzu wurden 3 ml Extrakt in 1 ml konzentrierter  $\text{H}_2\text{SO}_4$  mit Selenreaktionsgemisch verascht und der Kjeldahlkolben mit 25 ml Aqua dest. quantitativ ausgewaschen. Hiervon gaben wir 5 ml in die Kjeldahlapparatur und versetzten den Ansatz mit 5 ml einer 33% N-freien Natronlauge. In die Vorlage kamen 10 ml einer n/100  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Die Rücktitration geschah mit n/100 NaOH. Den Umschlag bestimmten wir acidimetrisch mit Tashiro-Indikator.

Die erzielten Werte sind in Tabelle 9 angegeben.

Tabelle 9

| Stamm | Extrakteingabe<br>in ml | N-Gehalt<br>in mg% | Mittelwerte des Proteingehaltes<br>in mg/ml |
|-------|-------------------------|--------------------|---------------------------------------------|
| A     | 3                       | 4,32               | 0,705                                       |
| A     | 3                       | 4,35               |                                             |
| A     | 3                       | 4,37               |                                             |
| B     | 3                       | 4,26               | 0,702                                       |
| B     | 3                       | 4,24               |                                             |
| B     | 3                       | 4,27               |                                             |
| C     | 3                       | 4,19               | 0,685                                       |
| C     | 3                       | 4,21               |                                             |
| C     | 3                       | 4,26               |                                             |

Tabelle 9: Bestimmung des M-Proteingehaltes des gereinigten Extraktes  
Der N-Gehalt wurde hierzu mit 16,25 multipliziert.

Mit den restlichen 14 ml Extrakt der Stämme A, B und C stellten wir die serologische Reaktivität fest. Hierzu legten wir für jeden Stamm 3 Verdünnungsreihen an. Dabei verfahren wir folgendermaßen:

Wir nahmen 1 ml Extrakt (gereinigte M-Substanz) des Stammes A und setzten zu 1 ml physiologischer NaCl-Lösung (Verdünnung 1:2). Dann mischten wir gut durch und entnahmen erneut einen ml, den wir wieder zu 1 ml physiologischer Kochsalzlösung gaben (= Verdünnung 1:4). Auf die gleiche Weise wurden für jeden Stamm drei Reihen der folgenden Verdünnungsstufen hergestellt:

|       |       |       |       |
|-------|-------|-------|-------|
| 1:2   | 1:3   | 1:3,5 | 1:5   |
| 1:4   | 1:6   | 1:7   | 1:10  |
| 1:8   | 1:12  | 1:14  | 1:20  |
| 1:16  | 1:24  | 1:28  | 1:40  |
| 1:32  | 1:48  | 1:56  | 1:80  |
| 1:64  | 1:96  | 1:112 | 1:160 |
| 1:128 | 1:192 | 1:224 | 1:320 |
| 1:256 | 1:384 | 1:448 | 1:560 |

Anschließend füllten wir in 3 cm lange Präzipitationsröhrchen mit einer lichten Weite von 0,5 - 1 mm das gleiche konstante Antiserum von A-Streptokok-

ken des Typs 14. Dann befestigten wir die Röhrchen in einem Plastillinblock und überschichteten das Antiserum mit den oben angegebenen Antigenverdünnungen der Stämme A, B und C. Die Versuche wurden für jeden Stamm 3 mal wiederholt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle angegeben:

Tabelle 10

| A-Streptokokken | konstantes Anti-M-Serum | Endtiter der Antigenverdünnungen      |
|-----------------|-------------------------|---------------------------------------|
| Stamm A         | Antiserum des Typs 14   | 1 : 124 (126 ?)<br>1 : 126<br>1 : 128 |
| Stamm B         | "                       | 1 : 106<br>1 : 109<br>1 : 109         |
| Stamm C         | "                       | keine Präzipitatabildung              |

Tabelle 10: Endtiter der Antigenverdünnungen der verschiedenen virulenten A-Streptokokkenstämme A, B und C

### Zusammenfassung der Ergebnisse:

Aus einem A-Streptokokkenstamm hatten wir drei verschieden virulente Stämme (A, B und C) gezüchtet. Bei der Virulenzmessung hatte Stamm A eine LD<sub>50</sub> von 1 : 360 600, Stamm B eine von 1 : 3, 6, und Stamm C war vollkommen avirulent.

Gleichzeitig isolierten wir die M-Substanz nach dem Verfahren von LANCEFIELD und PERLMANN (56) und fanden für Stamm A einen N-Gehalt von 4,34 mg%, für Stamm B einen N-Gehalt von 4,32 mg% und für Stamm C einen N-Gehalt von 4,22 mg%. Hieraus errechneten wir die Mittelwerte des M-Proteingehaltes in mg/ml. Anschließend prüften wir die serologische Reaktivität der M-Substanz der drei verschieden virulenten A-Streptokokkenstämme Typ 14. Dabei konnte folgendes festgestellt werden:

Stamm A zeigte bei der Ringpräzipitation eine positive Reaktion bis zur Antigenverdünnung von 1 : 126, Stamm B bis 1 : 108 und Stamm C ergab auch

bei unverdünntem Antigen keine Reaktion. . . .

Diese Befunde zeigen, daß die verschiedenen virulenten A-Streptokokkenstämme Typ 14 mit der M-Substanzisolierung nach LANCEFIELD und PERLMANN (56) etwa gleiche Proteinmengen liefern. Es scheint somit kein wesentlicher Unterschied im Proteingehalt des virulenten als auch des avirulenten A-Streptokokkenstammes Typ 14 zu bestehen.

Allerdings weist das Protein des hoch- und schwachvirulenten Stammes gegen M-14-Antiserum eine serologische Aktivität auf, während das Protein des avirulenten Stammes keine Präzipitation veranlaßte. Diese Ergebnisse bestätigten den Zusammenhang zwischen spezifischer M-Substanzproduktion und dem Virulenzverhalten der Keime. Sie stimmen mit Befunden von BARKULIS (4) überein, der ebenfalls einen gleichen Proteingehalt eines avirulenten und des daraus gezüchteten virulenten A-Streptokokkenstammes Typ 14 beobachten konnte. Die Aminosäurezusammensetzung der Extrakte beider Mutanten war die gleiche, außer kleinen Abweichungen, die in die Fehlergrenze der Bestimmungsmethoden fielen.

Da avirulente und virulente A-Streptokokkenstämme Typ 14 ein quantitativ und qualitativ gleiches Protein produzieren, scheint die Virulenz nicht von der Menge des produzierten Proteins, sondern von einer Strukturveränderung dieses Proteins abhängig zu sein.

Da die aus einem A-Streptokokkenstamm Typ 14 gezüchtete avirulente Mutante keine serologische Aktivität gegen Typ 14 Antiserum zeigte, während der virulente A-Streptokokkenstamm Typ 14 eine Präzipitation auslöste, war zu vermuten, daß mit dem Virulenzanstieg auch eine Steigerung der serologischen Aktivität auftritt. Zur Prüfung dieses Verhaltens bezogen wir die serologische Aktivität auf den Proteingehalt des nach LANCEFIELD und PERLMANN (56) gewonnenen Extraktes.

Hierbei zeigte sich, daß der hochvirulente Stamm A (A-Streptokokken Typ 14) eine positive Ringpräzipitation bis zu einer M-Antigenverdünnung von 0,0055 mg/ml ergab, und der schwach-virulente Stamm B (A-Streptokokken Typ 14) bis zu einer M-Antigenverdünnung von 0,0067 mg/ml präzipitierte.

Die in ihrer Virulenz stark verschiedenen Stämme hatten nur geringe Unterschiede in ihrer serologischen Aktivität. Der Virulenzanstieg dürfte demnach mit einer geringen Erhöhung der spezifischen M-Substanz einhergehen.

Allerdings muß beachtet werden, daß die Bestimmungsmethoden relativ grob sind und nur kleine M-Substanzmengen zur Verfügung standen. Außerdem

kann die M-Substanz bei der Säurehydrolyse eine Strukturveränderung erfahren.

Zur Übersicht sind die einzelnen Befunde noch einmal in der folgenden Tabelle aufgezeichnet:

Tabelle 11

|                                                  | Stamm A               | Stamm B                    | Stamm C                    |
|--------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------|----------------------------|
| Anzahl der Passagen                              | 66 Mäuse-<br>passagen | 142 Nährboden-<br>passagen | 242 Nährboden-<br>passagen |
| LD <sub>50</sub>                                 | 1 : 360 600           | 1 : 3, 16                  | kein Tier                  |
| Mittelwerte des N-Gehaltes des Extraktes in mg % | 4, 34                 | 4, 32                      | 4, 22                      |
| Endtiter der Antigenverdünnungen                 | 1 : 126               | 1 : 108                    | -                          |
| M-Proteingehalt des Endtiters                    | 0, 0055               | 0, 0067                    | -                          |

Tabelle 11: Tabellarische Zusammenstellung der Ergebnisse

## DISKUSSION

Untersuchungen über die M-Substanz sind gerade im Hinblick auf ihre biologische Leistung von besonderem Interesse, da drei ganz entscheidende Faktoren der Streptokokkenpathologie in ihr den substantiellen Träger der Funktion haben. Dies ist:

1. Ihre direkte Beziehung zur Virulenz, die im wesentlichen in der anti-phagocytären Leistungsfähigkeit gesehen wird;
2. die spezifische Infektionsimmunität, die ausschließlich durch die M-Substanz bestimmt wird;
3. die im Schrifttum immer wieder diskutierte Frage der Bildung von Koppelungsantigenen durch die M-Substanz.

Die in der vorliegenden Arbeit behandelte Frage einer quantitativen Beziehung zwischen dem Virulenzverhalten eines A-Streptokokkenstammes und seinem M-Substanzbildungsvermögen wurde von uns an der Isolierung der M-Substanz aus der hochvirulenten, schwach-virulenten und avirulenten Mutante ein und desselben Ausgangsstammes untersucht.

Als Kriterium für die isolierte M-Substanz stand uns die serologische Reaktivität zur Verfügung. Da diese auf den N-Gehalt pro Volumeneinheit extrahierte Fraktion bezogen und ferner die Extraktionsmethode bei allen drei Stammvarianten die gleiche war, konnten wir auf die Angabe eines Absolutwertes, der aus dem Streptokokkensediment komplett isolierbaren M-Substanz verzichten.

Es zeigte sich nämlich, daß aus einem solchen A-Streptokokkensediment nach einer 2. - 4. Extraktion weitere Spuren von serologisch aktivem Material isoliert werden konnten.

Um einheitliche Bedingungen - insbesondere im Hinblick auf den avirulenten und gänzlich M-substanzfreien Stamm - zu haben, begnügten wir uns mit einer einmaligen Extraktion nach LANCEFIELD (56) und untersuchten hieran die serologische Aktivität mit der quantitativ abgestuften Ringpräzipitation. Die Einzeldaten sind somit Relativwerte.

Es zeigte sich, daß der hoch-virulente (A) und schwach-virulente (B) A-Streptokokkenstamm Typ 14 M-Protein produziert, und zwar bezogen auf den Stickstoff in einer Aktivität von  $A = 0,0055$  und  $B = 0,0067$  mg Protein/ml, während die avirulente Mutante (C) etwa die gleiche Proteinmenge ohne serologische Aktivität gegen das spezifische Antiserum aufweist.

Auffallend bei den Befunden ist, daß die serologische Aktivität/Proteinmengen zwischen dem hoch-virulenten und mäßig virulenten Stamm relativ geringfügig ist, wohingegen die Virulenz, gemessen an der  $LD_{50}$  ( $A = 1 : 360\,600$ ,  $B = 1 : 3,16$ ), zwischen diesen beiden Stämmen stark differiert.

Die völlig avirulente Mutante zeigt, wie schon erwähnt, keine serologische Aktivität gegen M-Antikörper.

Damit ist die Fragestellung der vorliegenden Arbeit beantwortet. Es ist jedoch zu berücksichtigen, daß sich die quantitative Aussage auf die Funktion, nämlich auf die Fähigkeit der serologischen Aktivität, bezieht. Diese war nicht nur beim virulenten Stamm am ausgeprägtesten und beim avirulenten auf Null herabgesunken, sondern sie erwies sich auch in der Induktion von Antikörpern beim hochvirulenten Stamm am aktivsten, so daß auch die ange-

deutete Tendenz eines vielleicht etwas höheren Eiweißgehaltes des hochvirulenten Stammes auch als Träger für die von uns nachgewiesenen Aktivitätssteigerung verantwortlich gemacht werden kann. Da die Differenz zu geringfügig ist, um eine Aussage zu machen, muß diese Frage offen bleiben.

## ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit gaben wir zunächst eine literarische Übersicht der Virulenzfaktoren von A-Streptokokken, wobei insbesondere auf die Stellung der M-Substanz eingegangen wurde. Dann versuchten wir aufzuzeigen, ob eine Relation zwischen dem Virulenzverhalten und der serologischen Reaktivität eines A-Streptokokkenstammes besteht. Hierzu führten wir quantitative Bestimmungen an einem Modell drei verschieden virulenter A-Streptokokkenstämme aus. Dabei zeigte sich, daß die im Extrakt nachgewiesene serologische Aktivität, bezogen auf den Proteingehalt, in deutlicher Abhängigkeit vom Virulenzgrad steht, wobei der Unterschied zwischen Stamm A und B gering, aber zwischen Stamm A und C sehr deutlich war.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ARMBRÜSTER, A.  
Die epidemiologische Bedeutung der serologischen Gruppendifferenzierung der Streptokokken.  
Amtsärztliche Prüfungsarbeit, Hygiene-Institut Mainz (1959)
2. BARKULIS, S. S. and JONES, M. F.  
Studies of streptococcal cell walls. I. Isolation, chemical composition, and preparation of M protein.  
J. Bact. 74, 207 (1957)
3. BARKULIS, S. S., WALSH, G. and EKSTEDT, R. D.  
Studies of streptococcal cell walls. II. Type-specific antigenicity in rabbits.  
J. Bact. 76, 109 (1958)
4. BARKULIS, S. S.  
Biochemical properties of a virulent and an avirulent strain of group A hemolytic streptococcus.  
Ann. N. Y. Acad. Sci. 88, 1034 (1960)
5. BARNARD, W. G. and TODD, E. W.  
Lesions in the mouse produced by streptolysin O and S.  
J. Path. Bact. 51, 43 (1940)
6. BERNHEIMER, A. W.  
Streptolysins and their inhibitors. Streptococcal Infections.  
Columbia University Press, New York (1954)
7. BERNHEIMER, A. W., LAZARIDES, P. D. and WILSON, A. T.  
Diphosphopyridin nucleotidase as an extracellular product of streptococcal growth.  
J. exp. Med. 106, 27 (1956)
8. BORDET, J.  
zit. FOLEY (22)
9. CHAMBERS, L. A., BATEMAN, J. B. and CALKINS, H. E.  
Further studies of the orientation of reactive sites in thin films of streptococcal antigens.  
J. Immunol. 40, 483 (1941)
10. COBURN, A. F. and PAULI, R. H.  
Studies on the serological typing of streptococcus haemolyticus.  
J. exp. Med. 65, 595 (1936)

11. COBURN, A. F. and PAULI, R. H.  
Studies on the immune response of the rheumatic subject and its relationship to activity of the rheumatic process.  
*J. exp. Med.* 52, 137 (1937)
12. CUMMINS, C. S. and HARRIS, H.  
The chemical composition of the cell wall in some gram-positive bacteria and its possible value as a taxonomic character.  
*J. gen. Microbiol.* 14, 583 (1956)
13. DAWSON, M. H., HOBBY, G. L. and OLMSTEADT, M.  
Variation in the hemolytic streptococci.  
*J. infect. Dis.* 62, 138 (1938)
14. DENNY, F. W.  
The prophylaxis of streptococcal infections.  
*Streptococcal Infections* (Editor: M. McCarty).  
Columbia University Press, New York (1954)
15. DINGLE, J. H.  
The clinical pattern of streptococcal infections in man.  
*Streptococcal Infections* (Editor: M. McCarty).  
Columbia University Press, New York (1954)
16. DOCHEZ, A. R., AVERY, O. T. and LANCEFIELD, R. C.  
Studies on the biology of streptococcus. I. Antigenic relationship between strains of streptococcus haemolyticus.  
*J. exp. Med.* 30, 179 (1919)
17. DUBOS, R. J.  
The bacterial cell.  
Harvard University Press, Cambridge, Mass. (1949)
18. ELLIOT, St. D.  
A proteolytic enzyme produced by group A-streptococci with special reference to its effect on the type-specific M antigen.  
*J. exp. Med.* 81, 73 (1945)
19. ELLIOT, St. D. and DOLE, V. P.  
An inactive precursor of streptococcal proteinase.  
*J. exp. Med.* 85, 305 (1947)
20. ELLIOT, St. D. and DOLE, V. P.  
The crystallization and serological differentiation of streptococcal proteinase and its precursor.  
*J. exp. Med.* 92, 201 (1950)

21. ELLIOT, St. D.  
Streptococcal proteinase. Streptococcal Infections (Editor: M. McCarty).  
Columbia University Press, New York (1954)
22. FOLEY, M. J. a. M. R. and WOOD, W. B.  
Studies on the pathogenicity of group A streptococci.  
I. Its relation to surface phagocytosis.  
J. exp. Med. 110, 603 (1959)
23. FOLEY, M. J. and WOOD, W. B.  
Studies on the pathogenicity of group A streptococci.  
II. Reaction of the antiphagocytic effects of the M protein and the capsular pel.  
J. exp. Med. 110, 617 (1959)
24. FOX, E. N. and KRAMPITZ, L. O.  
Purification of streptococcal antigen by cationic exchange.  
Federation Proc. 12, 442 (1953)
25. FOX, E. N. and KRAMPITZ, L. O.  
Studies on the biosynthesis of the M-protein of group A hemolytic streptococci.  
J. Bact. 71, 454 (1956)
26. FULLER, A. T.  
The formamid method for the extraction of polysaccharides from hemolytic streptococci.  
Brit. J. exp. Path. 19, 130 (1938)
27. GRIFFITH, F.  
Types of hemolytic streptococci in relation to scarlet fever.  
J. Hyg. 26, 263 (1927)
28. GRIFFITH, F.  
The serological classification of streptococcus pyogenes.  
J. Hyg. 34, 542 (1934)
29. GRUMBACH, A.  
Die Streptokokkeninfektionen. Die Infektionskrankheiten des Menschen und ihre Erreger. Bd. I.  
G. Thieme, Stuttgart (1958)
30. HARE, R.  
The classification of hemolytic streptococci from the nose and throat of normal human beings by means of precipitin and biochemical tests.  
J. Path. Bact. 41, 499 (1935)

31. HAYASHI, J. A. and BARKULIS, S. S.  
Studies on the streptococcal cell wall. III. The aminoacids of the  
trypsin treated cell wall.  
J. Bact. 77, 177 (1959)
32. HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F. E.  
Protein fractions of a scarlatinal strain of streptococcus hemolyticus.  
J. exp. Med. 54, 515 (1931)
33. HEIDELBERGER, M. and KENDALL, F. E.  
Carbohydrate containing proteins of the hemolytic streptococcus.  
J. Immunol. 30, 267 (1936)
34. HINSBERG, K. und LANG, K.  
Medizinische Chemie für den klinischen und theoretischen Gebrauch.  
Urban u. Schwarzenberg, München, 983 (1957)
35. JUI-PING WU  
Active immunisation of mice with hemolytic streptococci.  
J. Immunol. 40, 179 (1941)
36. KABAT, E. A. and MAYER's, M. M.  
Experimental Immunochemistry.  
Charles C. Thomas, Springfield, 476 (1961)
37. KARUSH, F., IACOCCA, V. F. and HARRIS, T. N.  
Growth of group A hemolytic streptococcus in the steady state.  
J. Bact. 72, 283 (1956).
38. KASS, E. H. and SEASTONE, C. V.  
The role of the mucoid polysaccharide (hyaluronic acid) in the  
virulence of group A hemolytic streptococci.  
J. exp. Med. 79, 319 (1944)
39. KENDALL, F. E., HEIDELBERGER, M. and DAWSON, H.  
A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains  
of group A hemolytic streptococcus.  
J. biol. Chem. 118, 61 (1937)
40. KLEIN, P.  
Zur Technik der Gruppenpräzipitationen bei Streptokokken.  
Zbl. Bact. I. Orig. 156, 484 (1951)
41. KLIEWE, H. und v. WASIELEWSKI, E.  
Begriff und Wesen der Pathogenität, Infektiosität und Virulenz  
von Bakterien.  
Ärztl. Fösch. 9, 2 (1957) und 11, 165 (1957)

42. KÖHLER, W.  
Die Typisierung hämolysierender Streptokokken der Gruppe A.  
I. Methoden der Typisierung und die Herstellung agglutinierender Seren.  
Z. Immun. Forsch. 120, 253 (1960)
43. LANCEFIELD, R. C.  
The immunological relationship of streptococcus viridans and certain of its chemical fractions.  
I. Serological reactions obtained with antibacterial sera.  
J. exp. Med. 42, 377 (1925)
44. LANCEFIELD, R. C.  
The immunological relationship of streptococcus viridans and certain of its chemical fractions.  
II. Serological reactions obtained with antinucleoprotein sera.  
J. exp. Med. 42, 397 (1925)
45. LANCEFIELD, R. C.  
The antigenic complex of streptococcus haemolyticus.  
I. Demonstration of type-specific substance in extracts of streptococcus haemolyticus.  
J. exp. Med. 47, 91 (1928)
46. LANCEFIELD, R. C.  
The antigenic complex of streptococcus haemolyticus.  
II. Chemical and immunological properties of the protein fractions.  
J. exp. Med. 47, 469 (1928)
47. LANCEFIELD, R. C.  
The antigenic complex of streptococcus haemolyticus.  
III. Chemical and immunological properties of the species-specific substance.  
J. exp. Med. 47, 481 (1928)
48. LANCEFIELD, R. C.  
The antigenic complex of streptococcus haemolyticus.  
IV. Anaphylaxis with two type-specific fractions.  
J. exp. Med. 47, 843 (1928)
49. LANCEFIELD, R. C.  
A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci.  
J. exp. Med. 57, 571 (1933)

50. LANCEFIELD, R. C.  
Type-specific antigens, M and T of matt and glossy variants of group A hemolytic streptococci.  
J.exp. Med. 71, 521 (1940)
51. LANCEFIELD, R. C.  
The significance of M and T antigens in the cross reactions between certain types of group A hemolytic streptococci.  
J.exp. Med. 71, 539 (1940)
52. LANCEFIELD, R. C.  
Specific relationship of cell composition to biological activity of hemolytic streptococci.  
The Harvey Lectures 36, 251 (1940/41)
53. LANCEFIELD, R. C.  
Studies on the antigenic composition of group A hemolytic streptococci.  
I. Effects of proteolytic enzymes on streptococcal cells.  
J.exp. Med. 78, 465 (1943)
54. LANCEFIELD, R. C. and STEWART, W. A.  
Studies on the antigenic composition of group A hemolytic streptococci.  
ii. The occurrence of strains in a given type containing M but no T antigen.  
J.exp. Med. 79, 79 (1944)
55. LANCEFIELD, R. C.  
Technical instructions and procedures employed in the production of streptococcus grouping and typing.  
Med. Research, New York (1947)
56. LANCEFIELD, R. C. and PERLMANN, G. E.  
Preparation and properties of type-specific M antigen isolated from a group A, type 1 hemolytic streptococcus.  
J.exp. Med. 96, 71 (1952)
57. LANCEFIELD, R. C. and PERLMANN, G. E.  
Preparation and properties of a protein (R antigen) occurring in streptococci of group A type 28 and in certain streptococci of other serological groups.  
J.exp. Med. 96, 83 (1952)
58. LANCEFIELD, R. C.  
Cellular constituents of group A streptococci concerned in antigenicity and virulence. Streptococcal Infections.  
Columbia University Press, New York (1954)

59. LANCEFIELD, R. C.  
Differentiation of group A streptococci with common R antigen into three serological types with special reference to bactericidal test.  
J. exp. Med. 106, 525 (1957)
60. LANCEFIELD, R. C.  
Occurrence of R antigen specific for group A type 3 streptococci.  
J. exp. Med. 108, 329 (1958)
61. LANCEFIELD, R. C.  
Persistence of type-specific antibodies in man following infection with group A streptococci.  
J. exp. Med. 110, 271 (1959)
62. LANCEFIELD, R. C.  
Current knowledge of type-specific M antigens of group A streptococci.  
J. Immunol., Vol. 89, Nr. 3 (1962)
63. LANCEFIELD, R. C.  
zit. v. WASIELEWSKI, E. (1958)
64. LEEDOM, J. M. and BARKULIS, S. S.  
Studies on the virulence of group A beta-hemolytic streptococci.  
J. Bact. 78, 687 (1959)
65. LYONS, Ch. and WARD, H. E.  
Studies on the hemolytic streptococcus of human origin.  
II. Observations on the protective mechanism against the virulent variants.  
J. exp. Med. 61, 531 (1935)
66. McCARTY, M.  
The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of streptomyces albus.  
I. The production and fractionation of the lytic enzymes.  
J. exp. Med. 96, 555 (1952)
67. McCARTY, M.  
The lysis of group A hemolytic streptococci by extracellular enzymes of streptomyces albus.  
II. Nature of the cellular substrate attacked by the lytic enzymes.  
J. exp. Med. 96, 569 (1952)
68. McCARTY, M.  
The biology of group A hemolytic streptococci.  
Rheumatic Fever (Editor: Thomas, L.)  
University of Minnesota Press, Minnesota (1952)

69. McCARTY, M.  
The antibody response to streptococcal infections. Streptococcal Infections (Editor: M. McCarty).  
Columbia University Press, New York (1954)
70. McCARTY, M. and LANCEFIELD, R. C.  
Variation in the group-specific carbohydrate of group A streptococci.  
I. Immunochemical studies on the carbohydrates of variant strains.  
J.exp. Med. 102, 11 (1955)
71. McCARTY, M.  
Variation in the group-specific carbohydrate of group A streptococci.  
II. Studies on the chemical basis for serological specificity of the carbohydrate.  
J.exp. Med. 104, 629 (1956)
72. McCARTY, M.  
The hemolytic streptococci. Bacterial and Mycotic Infection of Man.  
Philadelphia, Chapter 10 (1958)
73. McLEOD, C. M.  
zit. FOLEY (22)
74. McLEOD, C. M.  
Bacterial and Mycotic Infection of Man.  
J. B. Lippincott Co., Philadelphia, Chapter 4 (1958)
75. MAXTED, W. R.  
Preparation of streptococcal extracts for Lancefield grouping.  
Lancet 2, 255 (1948)
76. MAXTED, W. R.  
Preparation of cell vaccines (unveröffentlicht)
77. MILES, A. A.  
The meaning of Pathogenicity. Mechanism of microbial pathogenicity.  
Cambridge University Press, London (1955)
78. MORRIS, M. and SEASTONE, C. V.  
The relationship of M-protein and resistance to phagocytosis in the beta-hemolytic streptococci.  
J. Bact. 69, 195 (1955)
79. MUDD, St., PETTIT, H., LACKMAN, E. and MORGAN, I. M.  
The antigenic structure of hemolytic streptococci of Lancefield group A.  
J. Immunol. 36, 381 (1939)

80. OLATRE, J.  
zit. SCHMIDT, H. (94)
81. OTTE, H. J.  
zit. ARMBRÜSTER (1)
82. PARK, J. T.  
Uridine-5-pyrophosphate derivatives.  
I. Isolation from staphylococcus aureus.  
J. biol. Chem. 194, 877 (1952)
83. PARK, J. T. and STROMINGER, J. L.  
Mode of action of penicillin. Biochemical basis for the mechanism  
of action of penicillin and for its selective toxicity.  
Science 125, 99 (1957)
84. PIKE, R. M.  
Streptococcal hyaluronic acid and hyaluronidase.  
II. Production and subsequent destruction of hyaluronic acid by certain strains of group A streptococci.  
J. infect. Dis. 83, 12 (1948)
85. PIKE, R. M.  
The production of hyaluronic acid and hyaluronidase.  
III. Virulence of group A streptococci for mice in relation to the production and destruction of hyaluronic acid.  
J. infect. Dis. 83, 19 (1948)
86. RANTZ, L. A., RANDALL, E. and RANTZ, H. J.  
Immunisation of human beings with group A hemolytic streptococci.  
Amer. J. Med. 6, 424 (1949)
87. RANTZ, L. A. and RANDALL, E.  
Antibacterial precipitating antibodies in group A hemolytic streptococcus sore throat.  
Amer. J. Med. 2, 551 (1947)
88. REED, L. J. and MUENCH, H.  
A simple method of estimating fifty per cent endpoints.  
Amer. J. Hyg. 27, 493 (1938)
89. ROTHBARD, S. and TODD, E. W.  
Production of proteinase by hemolytic streptococci in various clinical conditions.  
J. exp. Med. 87, 283 (1948)
90. ROTHBARD, S. and WATSON, R. F.  
Variation occurring in group A streptococci during human infections. Progressive loss of M-substance to bacteriostasis.  
J. exp. Med. 87, 521 (1948)

91. ROTHBARD, S.  
Protective effect of hyaluronidase and type-specific anti-M-serum on experimental group A streptococcus infections in mice.  
*J.exp. Med.* 88, 325 (1948)
92. SALLMANN, B., BIRKELAND, J. M.  
The role of hyaluronidase in hemolytic streptococcal infections.  
*Ann. N.Y. Acad. Sci.* 52, 1062 (1950)
93. SALTON, M. R. J.  
The nature of cell walls of some gram-positive and gram-negative bacteria.  
*Biochem. biophys. Acta* 9, 334 (1952)
94. SCHMIDT, H.  
Fortschritte in der Serologie.  
Verlag Steinkopff, Darmstadt (1955)
95. SCHMIDT, W. C.  
Group A streptococcus polysaccharide. Studies in its preparation, chemical composition and cellular localisation after intravenous injection into mice.  
*J.exp. Med.* 95, 105 (1952)
96. SCHMIDT, W. C.  
The quantitative precipitin reaction of type 19 M protein antigen of group A streptococci and antistreptococcal rabbit sera.  
*J. Immunol.* 78, 178 (1957)
97. SCHMIDT, W. C.  
Type-specific antibody formation by injection of streptococcal M-protein.  
*J. infect. Dis.* 106, 250 (1960)
98. SEELEMANN, M.  
Biologie der Streptokokken.  
Verlag H. Carl, Nürnberg (1952)
99. SEVAG und Mitarb.  
zit. SCHMIDT, H. (94)
100. SLADE, H. D., KNOX, G. A., SLAMP, W. C.  
The amino acid nutrition of group A hemolytic streptococci with reference to effect of glutathione on the cystein requirement.  
*J. Bact.* 62, 669 (1951)
101. SLADE, H. D.  
Amino acid composition of a peptide mixture stimulatory for the growth of group A hemolytic streptococcus.  
*Bact. Proc.* p.76 (1951)

102. SWIFT, H. F., WILSON, A. T. and LANCEFIELD, R. C.  
Typing group A hemolytic streptococci by M precipitin reactions  
in capillarity pipettes.  
J. exp. Med. 78, 127 (1943)
103. SWIFT, H. F.  
The streptococci. Bacterial and Mycotic Infection of Man.  
J. B. Lippincott Comp., Philadelphia-London-Montreal (1948)
104. TEPPER, B. S., HAYASHI, J. A. and BARKULIS, S. S.  
Studies on the streptococcal cell walls.  
V. Amino acid composition of cell walls of virulent and avirulent  
group A hemolytic streptococci.  
J. Bact. 79, 33 (1960)
105. TODD, E. W. and LANCEFIELD, R. C.  
Variants of hemolytic streptococci: their relation to type-specific  
substance, virulence and toxin.  
J. exp. Med. 48, 751 (1928)
106. TODD, E. W.  
A study of the inhibition of streptococcal proteinase by sera of  
normal and immune animals and of patients.  
J. exp. Med. 85, 591 (1947)
107. UPDYKE, E. L. and CONROY, E.  
Reclamation of streptococcal cells for reuse in absorption of antisera.  
J. Bact., Vol. 66, Nr. 2 (1953)
108. v. WASIELEWSKI, E.  
Das Virulenzproblem der A-Streptokokken unter besonderer Berücksichtigung bestimmter Invasionsfaktoren.  
Habilitationsschrift, Mainz (1955)
109. v. WASIELEWSKI, E.  
Generationszeit und Virulenz von A-Streptokokken.  
Arch. Hyg. 141, 436 (1957)
110. v. WASIELEWSKI, E.  
Die Virulenz von A-Streptokokken im Verlauf verschiedener Wachstumsphasen.  
Z. Hyg. InfektKr. 144, 152 (1957)
111. v. WASIELEWSKI, E.  
Pathogenitätsmerkmale von A-Streptokokken als ätiologische Faktoren beim rheumatischen Fieber.  
Med. Welt, Nr. 1  
Friedrich-Karl-Schattauer-Verlag, Stuttgart (1963)

112. WATSON, R. F., ROTHBARD, S. and SWIFT, H. F.  
zit. v. WASIELEWSKI, E. (108)
113. WATSON, D. W.  
Host factors in experimental streptococcal infections.  
Streptococcal Infections (Editor: M. McCarty).  
Columbia University Press, New York (1954)
114. WILEY, G. G. and WILSON, A. T.  
The ability of group A streptococci killed by mercury arc irradiation to resist ingestion by phagocytosis.  
J. exp. Med. 103, 15 (1956)
115. WILSON, A. T.  
Loss of group A carbohydrate during mouse passages of group A hemolytic streptococci.  
J. exp. Med. 81, 593 (1945)
116. WILSON, A. T., WILEY, G. G., BRUNO, P.  
Fate of non-virulent group A streptococci phagocytized by human and mouse neutrophils.  
J. exp. Med. 106, 777 (1957)
117. WILSON, A. T.  
zit. GRUMBACH (29)
118. ZITTLE, Ch. A. and HARRIS, T. N.  
The antigenic structure of hemolytic streptococci of Lancefield group A.  
IV. Nucleoprotein components: Some chemical and serological properties and changes in both caused by certain enzymes.  
J. Immunol. 37, 1 (1939)



Es ist mir eine angenehme Pflicht, Herrn Professor Dr. Kliewe für die Überlassung eines Arbeitsplatzes in seinem Institut und Herrn Professor Dr. Klein für die Gewährung des Gastrechtes in seinem Institut recht herzlich zu danken.

Herrn Professor Dr. von Wasielewski möchte ich für seine Themenstellung und seine Hilfe bei der Durchführung der Versuche auf das herzlichste Dank sagen.



## LEBENS LAUF

Am 31. Januar 1938 wurde ich, Johann Riethe, als erster Sohn des Arbeiters Johann Riethe und seiner Ehefrau Magdalene, geb. Götzmann, in Sprendlingen/Rhein Hessen geboren. Ich bin evangelisch. Mein Vater verstarb 1942 infolge eines Kriegsleidens.

Nach vierjähriger Volksschulzeit besuchte ich sechs Jahre das naturwissenschaftliche Progymnasium in Sprendlingen. Anschließend wechselte ich in das Stefan George-Gymnasium in Bingen/Rhein und bestand dort im März 1957 die Reifeprüfung.

Im Sommersemester des gleichen Jahres begann ich das Medizinstudium an der Universität Mainz und schloß es im Januar 1963 mit dem Staatsexamen ab. Seit März 1963 bin ich als Medizinalassistent in der I. Medizinischen Klinik und Poliklinik der Universität Mainz.









